

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2004年1月8日 (08.01.2004)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2004/002459 A1

(51) 国際特許分類⁷: A61K 9/51,
47/42, 48/00, A61P 1/16, 35/00, 43/00

(21) 国際出願番号: PCT/JP2003/008244

(22) 国際出願日: 2003年6月27日 (27.06.2003)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2002-191386 2002年6月28日 (28.06.2002) JP
特願2003-183863 2003年6月27日 (27.06.2003) JP

(71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): 科学技術振興事業団 (JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY CORPORATION) [JP/JP]; 〒332-0012 埼玉県川口市本町四丁目1番8号 Saitama (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 黒田 俊一 (KURODA,Shunichi) [JP/JP]; 〒565-0872 大阪府吹田市上山田7番C-104号 Osaka (JP). 谷澤 克行 (TANIZAWA,Katsuyuki) [JP/JP]; 〒563-0214 大阪府豊能郡豊能町希望ヶ丘2-30-2 Osaka (JP). 近藤 昭彦 (KONDO,Akihiko) [JP/JP]; 〒657-0015 兵庫県神戸市灘区篠原伯母野山町1-2-806 Hyogo (JP). 上田 政和 (UEDA,Masakazu) [JP/JP]; 〒162-0837 東京都新宿区納戸町6 Tokyo (JP). 妹尾 昌治 (SENO,Masaharu) [JP/JP]; 〒703-8273 岡山県岡山市門田文化町2-10-13 Okayama (JP). 多田 宏子 (TADA,Hiroko) [JP/JP]; 〒700-0016 岡山県岡山市伊島町2-20-22-206 Okayama (JP).

(74) 代理人: 原謙三 (HARA,Kenzo); 〒530-0041 大阪府大阪市北区天神橋2丁目北2番6号 大和南森町ビル 原謙三国際特許事務所 Osaka (JP).

(81) 指定国(国内): KR, US.

(84) 指定国(広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR).

[続葉有]

(54) Title: HOLLOW NANOPARTICLE HAVING MODIFIED CYSTEINE RESIDUE AND DRUG WITH THE USE THEREOF

(54) 発明の名称: システイン残基を改変したタンパク質からなる中空ナノ粒子およびそれを用いた薬剤

(57) Abstract: A hollow nanoparticle which comprises a protein (for example, hepatitis B virus surface antigen protein) having a function of recognizing a specific cell such as a liver cell and being capable of forming a particle, wherein a cysteine residue of the protein is replaced by another amino acid. Thus, it is possible to provide a nanoparticle by which a substance can be specifically introduced into a target cell or tissue and which has a stabilized particle structure and enables efficient introduction of the substance, and a drug with the use thereof.

(57) 要約:

本発明は、肝細胞などの特定の細胞に対する認識能を有し、粒子形成能を有するタンパク質(例えば、B型肝炎ウィルス表面抗原タンパク質)からなる中空ナノ粒子において、当該タンパク質のシステイン残基を他のアミノ酸に置換した中空ナノ粒子である。これにより、目的の細胞や組織に特異的に物質を導入する中空ナノ粒子であって、粒子構造を安定化し、効率よく物質導入することができる中空ナノ粒子、およびこれを用いた薬剤を提供できる。

WO 2004/002459 A1



2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

明細書

システィン残基を改変したタンパク質からなる中空ナノ粒子およびそれ用いた薬剤

技術分野

5 本発明は、疾患治療用の細胞導入物質を封入することができる中空ナノ粒子に関し、より詳細には、粒子内部に封入された疾患治療用の細胞導入物質を特定細胞または組織内に特異的に導入可能な薬剤に関するものである。

10 背景技術

近年、医学の分野において、患部に直接作用し、高い効果を示す副作用の少ない薬品の開発が盛んに行われている。特に、ドラッグデリバリーシステム (DDS) と呼ばれる方法は、目的細胞、あるいは、目的組織に対して特異的に薬剤等の有効成分を運搬し、目的箇所で有効成分を作用させることのできる方法として注目されている。

目的細胞、あるいは、目的組織に対して特異的に薬剤となるタンパク質を送り込む方法としては、従来、当該タンパク質をコードする遺伝子が組み込まれた発現ベクターをエレクトロポレーション法等により目的細胞に導入して、この遺伝子を細胞内で発現させることによりタンパク質薬剤を細胞内に送り込むいわゆる遺伝子導入方法が開発されてきた。しかし、このような従来の遺伝子導入方法では、何れも、目的細胞、あるいは、目的組織に対して特異的にタンパク質薬剤を送

り込む方法としては不十分なものであった。

以上のような状況に鑑み、本発明者らは、国際公開番号WO 01/64930の国際出願（公開日2001年9月27日。以下、「国際出願WO 01/64930」という）において、粒子形成能を有するタンパク質に生体認識分子が導入された中空ナノ粒子を用いて、目的とする細胞や組織に、物質（遺伝子、タンパク質、化合物等）を特異的かつ安全に運搬、導入するための方法を提案しているが、この方法を応用しつつ目的の細胞または組織に対して物質をより効率的に導入するためのさらなる改良が課題となっていた。

本発明は、上記の課題に鑑みなされたものであり、その目的は、目的の細胞や組織に特異的に効率よく物質を導入するタンパク質中空ナノ粒子、およびこの中空ナノ粒子に細胞導入物質を包含させた薬剤を提供することにある。

15 発明の開示

本発明者らは、銳意検討を重ねた結果、粒子を形成するタンパク質のシステイン残基を改変することにより、粒子による物質の細胞特異的導入効率が飛躍的に高まることを見出し、本発明を完成させるに至った。

即ち、本発明に係る中空ナノ粒子は、特定の細胞（例えば肝細胞など）に対する認識能を有し、粒子形成能を有するタンパク質からなる中空ナノ粒子において、当該タンパク質におけるシステイン残基を改変した中空ナノ粒子である。

上記「粒子形成能を有するタンパク質」としては、例えばB型肝炎

5 ウィルス表面抗原タンパク質を挙げることができる。このタンパク質は、真核細胞で発現させると、小胞体膜上に膜タンパク質として発現、蓄積され、粒子として放出される。本発明の中空ナノ粒子は、このような粒子形成能を有するタンパク質をコードする遺伝子を含むベクターによって真核細胞（例えば哺乳類等の動物細胞または酵母）を形質転換させ、当該真核細胞に遺伝子発現させることにより製造することができる。

10 上記B型肝炎ウィルス表面抗原タンパク質を用いて形成された粒子は、肝細胞を認識し、肝細胞に対して特異的に粒子内の物質を運搬することができるので、肝臓疾患治療用の物質（遺伝子等）を包含させることにより、肝細胞に対して特異的かつ効果的に作用する有効な治療薬となる。

15 また、例えば上記B型肝炎ウィルス表面抗原タンパク質を、本来の肝細胞に対する感染能を欠失するように改変し、さらに増殖因子や抗体を提示するように改変し、このように改変されたB型肝炎ウィルス表面抗原タンパク質を用いて粒子を形成することで、肝細胞以外の特定の細胞に対して特異的に粒子内の物質を運搬することができる。例えば、ある癌細胞を特異的に認識する抗体を提示させることで、その癌細胞を認識し、その癌細胞に対して特異的に粒子内の物質を運搬することができる。

20 上記B型肝炎ウィルス表面抗原タンパク質における後述のSタンパク質は、タンパク質の酸化還元に関与するシステイン（Cys）残基を合計14個有している。これらのCys残基は形成された粒子の構造を制御していると考えられるが、粒子の精製過程あるいは保存中にCys残

基同士の過剰なジスルフィド結合により、タンパク質の分子間および分子内に不規則なジスルフィド架橋が生じてポリマー化し安定性に欠ける。そこで、これら Cys 残基のうち上記構造の制御に重要でないものを改変することによって（あるいは、これら Cys 残基以外で粒子形成能や細胞認識能に実質的な影響を与えない Cys 残基を改変することによって）ポリマー化を防ぎ、これにより、粒子に安定性が付与され、また、中空ナノ粒子への物質の封入効率が向上するので、包含する物質を効率よく細胞に導入することができる。
5

具体的には、B 型肝炎ウィルス表面抗原タンパク質の、S タンパク質アミノ酸配列における N 末端部分から数えて 76, 90, 139, 147, 149, 22 10 1 番目のシステイン残基を置換し、かつ、137, 138 番目のシステイン残基から選ばれる少なくとも 1 つを置換するのが好ましい。

Cys 残基の改変は、他のアミノ酸への置換が好ましいが、Cys 残基を欠失させるような改変を行ってもよい。B 型肝炎ウィルス表面抗原タンパク質は膜貫通型の膜タンパク質であるので、粒子外、脂質二重層膜内部および粒子内の各部にまたがって存在するが、Cys 残基を置換するアミノ酸は、脂質二重層膜内部に存在すると予測される Cys 残基は疎水性のアミノ酸（例えばアラニン（Ala）残基）に、粒子外部および内部に存在すると予測される Cys 残基は親水性のアミノ酸（例えばセリン（Ser）残基）に置換するのが好ましい。
15 20

システイン残基の改変は、上記粒子形成能を有するタンパク質をコードする遺伝子に変異を導入し、例えば、変異遺伝子を含むベクターにて真核細胞を形質転換させ、当該真核細胞において上記変異遺伝子を発現させる等の方法で改変された中空ナノ粒子を作製することができます。

きる。

また、本発明の中空ナノ粒子に治療物質を包含させた薬剤では、静脈注射という簡便な方法で特定の細胞または組織における疾患を効果的に治療することができ、従来の治療方法と大きく異なり、多量の薬剤の投与や遺伝子治療等における外科手術を必要とせず、副作用の心配も極めて低く、そのまま臨床応用可能なものである。

本発明の治療方法は、本発明の薬剤を投与することによる疾患の治療方法である。

10 図面の簡単な説明

図1は、本発明に係る中空ナノ粒子を構成するHBsAg Lタンパク質であって、Cys残基が置換される前の状態のタンパク質の概略模式図である。

図2は、本発明に係る中空ナノ粒子を構成するHBsAg Sタンパク質であって、Cys残基が置換される前の状態のタンパク質のアミノ酸配列を示している。

図3は、本発明に係る中空ナノ粒子を構成するHBsAg Lタンパク質をコードする遺伝子プラスミドの作成方法を示している。

図4(a), 図4(b)は、本発明に係る中空ナノ粒子を構成するHBsAgタンパク質の1次構造を直線で表した模式図であり、図4(a)はCys残基を1箇所置換したHBsAgタンパク質を、図4(b)は2ヶ所以上置換したHBsAgタンパク質を示している。

図5は、本発明に係る中空ナノ粒子の抗原性を野生型を100として算出した相対値として示している。

図 6 (a) ~ 図 6 (h) は、本発明に係る H B s A g 粒子を還元条件(図 6 (a) ~ 図 6 (d))、または非還元条件(図 6 (e) ~ 図 6 (h))でウェスタンブロッティングした電気泳動写真を示している。

図 7 (a) 図 7 (b) は、本発明に係る H B s A g 粒子を用いて H e p G 2 細胞へ遺伝子を導入した場合の導入効率を示している。

図 8 (a) ~ 図 8 (f) は、本発明に係る H B s A g 粒子である B N P - L m 8 を用いて H e p G 2 細胞へ遺伝子を導入した場合の導入効率を示している。

図 9 (a) ~ 図 9 (c) は、本発明に係る H B s A g 粒子である B N P - L m 8 を用いて H e p G 2 細胞へ遺伝子を導入した場合の導入効率を示し、図 8 (a), (e), (f) を拡大した図面である。

図 10 (a) ~ 図 10 (d) は、本発明に係る H B s A g 粒子である B N P - L m 8 を 1 週間 4 °C で保存したものを用いて H e p G 2 細胞へ遺伝子を導入した場合の導入効率を示している。

図 11 (a) ~ 図 11 (d) は、本発明に係る H B s A g 粒子である B N P - L m 8 を用いて H e p G 2 細胞へ遺伝子を導入した場合の導入効率を示している。

図 12 (a) ~ 図 12 (d) は、本発明に係る H B s A g 粒子である B N P - L m 8 を用いて W i D r 細胞へ遺伝子を導入した場合の導入効率を示している。

図 13 (a) ~ 図 13 (h) は、本発明に係る H B s A g 粒子である B N P - L m 8 と、B N P - L m 7 b と用いて H e p G 2 細胞へ遺伝子を導入した場合の導入効率を比較したものである。

発明を実施するための最良の形態

本発明の中空ナノ粒子は、粒子形成能を有するタンパク質のシステム残基を改変してなるものであるが、その粒子形成能を有するタンパク質に生体認識分子（換言すれば、特定の細胞を認識する分子）を導入することによって、目的細胞あるいは目的組織に特異的に物質を運搬することができる。このような粒子形成能を有するタンパク質としては、種々のウイルスから得られるサブウイルス粒子を適用することができる。具体的には、B型肝炎ウイルス（Hepatitis B Virus: HBV）表面抗原タンパク質等が例示される（以下、このB型肝炎ウイルス表面抗原タンパク質を「HBsAg」と略記する場合がある）。

また、このような粒子形成能を有するタンパク質からなるタンパク質粒子としては、真核細胞でタンパク質を発現させることにより得られるものが挙げられる。つまり、真核細胞で粒子形成能を有するタンパク質を発現させると、同タンパク質は、小胞体膜上に膜タンパク質として発現、蓄積され、粒子として放出されるのである。このとき、真核細胞としては、哺乳類等の動物細胞、酵母等が適用できる。

本発明者らは、遺伝子組換え酵母で上記HBsAgのLタンパク質（後述の実施例参照）を発現させることにより、発現されたHBsAgのLタンパク質から酵母由来の脂質二重膜に多数の同タンパク質が埋め込まれた短径約20nm、長径約150nmの橢円状中空粒子が形成されることを見出し、報告している（J. Biol. Chem., Vol. 267, No. 3, 1953-1961, 1992）。このような粒子は、HBVゲノムを全く含まないので、ウイルスとしては機能せず、人体への安全性が極めて高い。また、HBVの肝細胞への極めて高い感染力を担う肝細胞特異的

レセプターを粒子表面に提示しているため、肝細胞に対して特異的に物質を運搬する運搬体としての効果も高いのである。

このように遺伝子組換え酵母を用いてタンパク質粒子を形成する方法は、菌体内の可溶性タンパク質から高効率で粒子が生産される点で好適である。

5

上記 H B s A g の S タンパク質（後述の実施例参照）は、タンパク質の酸化還元に関与するシステイン（Cys）残基を合計 14 個有している。これらの Cys 残基は形成された粒子の構造を制御していると考えられるが、粒子の精製過程あるいは保存中に Cys 残基同士の過剰なジスルフィド結合によりポリマー化し安定性に欠ける。そこで、これら Cys 残基のうち上記構造の制御に重要でないものを改変することによって、粒子に安定性を付与して保存を容易にし、また、中空ナノ粒子への物質の封入効率が向上するので、包含する物質を効率よく細胞に導入することができる。

15

改変される Cys 残基の部位は特に限定されるものではないが、H B s A g 粒子の機能を損なわないように改変する必要がある。H B s A g の L タンパク質は肝細胞認識部位である PreS1 や PreS2 と、S タンパク質とからなるが、S タンパク質においてはアミノ酸を改変しても H B s A g 粒子の機能への影響が少ないと考えられる。そこで、S タンパク質に含まれているシステイン（Cys）残基 14 個（図 1 の模式図中に「C」でその位置が示されている）の一部を改変することによって、H B s A g 粒子がその肝細胞認識能や粒子形成能を失わずにジスルフィド結合を解くことができると考えられる。

S タンパク質に含まれる 14 個の Cys 残基は、S タンパク質のアミノ

酸配列の N 末端部分から数えて、48, 65, 69, 76, 90, 107, 121, 124, 137, 138, 139, 147, 149, 221 番目に位置する(図 2 下線部)。図 1 の模式図に示すとおり、HBsAg タンパク質は膜貫通タンパク質であり、N 末端側の PreS 領域が粒子外部にあり、それに続く S タンパク質部分では膜を貫通して粒子内部へ入った後、再び膜を貫通して粒子外部に出、もう一度膜に入つて C 末端部分は膜内に留まつてゐる。つまり、S タンパク質は、3 つの膜貫通部位と粒子内部分と粒子外に露出した部分からなる。上述した 14 個の Cys 残基は、48, 65, 69 番目が粒子内に存在し、76, 90, 107 番目が第 2 の膜貫通領域に位置し、121, 124, 137, 138, 139, 147 番目が粒子外部に露出し、149, 221 番目が第 3 の膜貫通部位に位置すると予測されている。

この 14 個の Cys 残基の中で改変される Cys 残基は特に限定されるものではないが、膜貫通部位および粒子外部に存在する Cys 残基で C 末端に近い位置にあるものが好ましい。具体的には、76, 90, 137, 138, 139, 147, 149, 221 番目を置換したものが好ましく、これらの 8 つの Cys 残基から選ばれた複数の Cys 残基を置換したものがより好ましい。その中でも、上記 8 つの Cys 残基をすべて置換したもの、あるいは上記 8 つの Cys 残基のうち 137 番目以外または 138 番目の Cys 残基以外を置換したものが特に好ましい。

上記 Cys 残基を置換する場合に、Cys 残基を置換するアミノ酸は特に限定しないが、膜貫通部位に存在するアミノ酸は脂質 2 重膜の疎水性の層に存在することとなるので疎水性であることが好ましい。疎水性のアミノ酸は、アラニン、グリシン、イソロイシン、ロイシン、メチオニン、フェニルアラニン、プロリン、トリプトファン、チロシン、

バリンがあり、この中でもアラニン残基に置換するのが好ましい。一方、粒子外部および内部に存在すると予測される Cys 残基は親水性のアミノ酸に置換することが好ましい。親水性のアミノ酸は、アルギニン、アスパラギン、アスパラギン酸、グルタミン酸、グルタミン、ヒスチジン、リシン、セリン、スレオニンがあり、この中でもセリン残基に置換するのが好ましい。

5 Cys 残基の改変は、一般的に用いられる、部位特異的突然変異導入法を用いることができる。例えば、PCR法を利用して塩基配列に点変異を導入し変異タンパク質を作製する方法や、部位特異的突然変異誘発法 (Hashimoto-Gotoh, Gene 152, 271-275 (1995) 他) 等が挙げられる。また、文献「細胞工学別冊 新細胞工学実験プロトコール 秀潤社 241-248 (1993)」に記載の方法、さらには、市販のキット (例えば、Quikchange Site-Directed Mutagenesis Kit ストラタジーン社製) を利用する方法も可能である。

10 この中でも、アミノ酸置換には、特にPCR法を用いて変異を導入する方法が好ましい。これは具体的に説明すると、置換したい Cys 残基をコードする塩基配列部分に、変異を導入したプライマーをハイブリダイズさせてPCR法によって増幅させる方法である。これにより、Cys 残基が他のアミノ酸に置換されたLタンパク質をコードする遺伝子を増幅することができる。この遺伝子を上述したように、真核生物等を用いて発現させることで、Cys 残基が置換されたタンパク質からなる中空ナノ粒子を作成することができる。

また、本発明のタンパク質中空ナノ粒子では、以上のような方法によって得られた粒子表面のレセプターを任意の生体認識分子に改変す

ることにより、肝細胞以外にも、任意の細胞及び組織に極めて高い特異性で物質を運搬、導入することが可能となる。

もちろん、粒子形成能を有するタンパク質は、上記のB型肝炎ウィルス表面抗原タンパク質に限られるものではなく、粒子を形成することができるタンパク質であれば、どのようなものでもよく、動物細胞、植物細胞、ウィルス、菌類等に由来する天然タンパク質や、種々の合成タンパク質等が考慮される。また、例えばウィルス由来の抗原タンパク質等が生体内において抗体を惹起する可能性がある場合などは、改変して抗原性を減少させたものを粒子形成能を有するタンパク質として用いてもよい。例えば、粒子形成能を有するタンパク質としては、国際出願WO 01/64930に開示される抗原性を減少させたB型肝炎ウィルス表面抗原タンパク質であってもよいし、同国際出願に開示されるその他の改変型タンパク質（B型肝炎ウィルス表面抗原タンパク質を、遺伝子操作技術を用いて改変したタンパク質）であってもよい。また、B型肝炎ウィルス表面抗原タンパク質や同タンパク質を改変した改変型タンパク質に、さらに増殖因子や抗体などの他のタンパク質を付加したものを、粒子形成能を有するタンパク質として用いてもよい。

粒子形成能を有するタンパク質に導入される生体認識分子（粒子形成能を有するタンパク質に生体認識分子が含まれる場合と、粒子形成能を有するタンパク質に生体認識分子を融合（または直接間接に結合）させる場合とを両方含む）としては、例えば成長因子、サイトカイン等の細胞機能調節分子、細胞表面抗原、組織特異的抗原、レセプターなどの細胞および組織を識別するための分子、ウィルスおよび微

生物に由来する分子、抗体、糖鎖、脂質などが好ましく用いられる。具体的には、癌細胞に特異的に現れるE G F受容体やI L - 2受容体に対する抗体やE G F、またH B Vの提示するレセプターも含まれる。これらは、目的とする細胞、あるいは組織に応じて適宜選択される。

5 なお、ここで「生体認識分子」とは、特定の細胞を認識する分子（換言すれば、特定の細胞に対する認識能を本発明の中空ナノ粒子に付与する分子）のことをいう。

以上のように作製された本発明の中空ナノ粒子は、特定の細胞に対して特異的に細胞導入物質を送り込むものとして有用である。例えば、

10 本発明の中空ナノ粒子として、B型肝炎ウィルス表面抗原タンパク質からなる粒子を用い、これに細胞導入物質を包含した薬剤を静脈注射などによって体内に投与すれば、当該粒子は体内を循環し、粒子表面に提示した肝細胞特異的レセプターにより肝細胞に導かれ、感染する。

そして、細胞導入物質が肝細胞中に送り込まれ、細胞導入物質の肝臓

15 組織特異的な導入が行われる。

このタンパク質中空ナノ粒子に内包される細胞導入物質としては、例えばD N A、R N Aなどの遺伝子、天然あるいは合成タンパク質、オリゴヌクレオチド、ペプチド、薬剤、天然あるいは合成化合物など、どのようなものであってもよい。

20 これらの細胞導入物質を上記の中空ナノ粒子に封入する方法としては、通常の化学的、分子生物学的実験手法で用いられる様々な方法が適用される。たとえば、エレクトロポレーション法、超音波法、単純拡散法、あるいは電荷を有する脂質を用いる方法等が好ましく例示される。また、細胞導入物質としてタンパク質を用いる場合は、粒子形

成能を有するタンパク質に細胞導入物質を融合させて粒子形成する方法もある。粒子形成能を有するタンパク質に細胞導入物質を融合させる方法とは、例えば、B型肝炎ウィルス表面抗原タンパク質をコードする遺伝子と、その下流側に上記タンパク質薬剤をコードする遺伝子とが挿入されたプラスミドを作製し、このプラスミドを用いて真核細胞に粒子を形成させることによって、粒子を形成するB型肝炎ウィルス表面抗原タンパク質にタンパク質薬剤が融合した薬剤を製造する方法である。

なお、薬剤の投与方法としては、静脈注射による投与のほかに、経口投与、筋肉内投与、腹腔内投与、皮下投与等が挙げられる。

このように、本発明の薬剤を用いれば、in vivoあるいはin vitroで細胞、または組織に特異的に物質を導入することができ、特定細胞または組織に物質を導入することを各種疾患の治療法あるいは治療法の1ステップとして行うことも可能になるのである。

以下、添付した図面に沿って実施例を示し、この発明の実施の形態についてさらに詳しく説明する。もちろん、この発明は以下の例に限定されるものではなく、細部については様々な態様が可能であることは言うまでもない。

(実施例)

以下の実施例において、HBsAgとは、HBVの外被タンパク質であるB型肝炎ウィルス表面抗原 (Hepatitis B virus surface Antigen) を示す。HBsAgは、図2に示すように226個のアミノ酸から構成されるSタンパク質を含んでいる。Sタンパク質のN末端側に55アミノ酸 (pre-S2 peptide) が付加したものがMタンパク質、

Mタンパク質のN末端側に、108もしくは119アミノ酸 (pre-S1 peptide) が付加したものがLタンパク質である。

HBsAg Lタンパク質の上記Pre-S領域 (pre-S1, pre-S2) は、HBVが肝細胞に結合する際に、それぞれ重要な役割を担うことが知られている。Pre-S1は、肝細胞に直接結合する部位を持ち、pre-S2は、血中の重合アルブミンを介して肝細胞に結合する重合アルブミンレセプターを有するのである。

真核細胞でHBsAgを発現させると、同タンパク質は、小胞体膜上に膜タンパク質として発現、蓄積される。HBsAgのLタンパク質は、分子間で凝集を起こし、小胞体膜を取り込みながら、出芽様式でルーメン側に粒子として放出される。

以下の実施例では、HBsAgのLタンパク質を用いた。

(実施例1) Cys 残基が置換されたHBsAg Lタンパク質をコードする遺伝子プラスミドの作成

発明者らによって報告された J.Biotechnol., Vol. 33:, No. 2, 157-174, 1994 記載の方法に基づいて、pGLDL II P39-RcTに組み込まれたHBsAg Lタンパク質をコードする遺伝子断片を、動物細胞発現用プラスミド pTB1455 の SR α' プロモーターの下流に組み込んで、pB0442 プラスミドを得た。HBsAg Lタンパク質の塩基配列は配列番号1に示され、アミノ酸配列は配列番号2に示されている。得られた pB0442 プラスミドにより、DNAをメチル化する大腸菌 K12 株 (DH 5 α または XL-1 Blue) を形質転換し、メチル化された pB0442 プラスミドを精製した。

pB0442 プラスミドのHBsAg Lタンパク質をコードする領域に

において、Cys 残基をコードする塩基配列を、Ala 残基もしくは Ser 残基をコードする塩基配列に改変するために、pB0442 プラスミドを鑄型として PCR 法を用いた部位特異的突然変異導入法により変異を導入した。以下に図 3 を用いて 48 番目の Cys 残基が Ser 残基に置換された 5 H B s A g L タンパク質遺伝子プラスミドの作成方法を例に挙げて詳細に説明する。

鑄型プラスミドとしての pB0442 プラスミドは図 3 に示すように、SR_{α'} プロモーターとその下流に H B s A g L タンパク質をコードする領域を有している。このプラスミドにおける H B s A g L タンパク質 10 の 48 番目の Cys 残基をコードするコドン (tgt) を含む領域に、変異を導入した合成オリゴヌクレオチド (プライマー) をハイブリダイズさせて、当該プラスミドを鑄型として PCR 反応により、鎖を伸長させた。ここで、変異を導入したプライマーは、鑄型の 48 番目の Cys 残基のコドンとミスマッチ (鑄型が tgt、プライマーが aga) となるように 15 設計した。これによって、48 番目の Cys コドン (tgt) が Ser コドン (tct) に置換されたプラスミドを増幅することができる。

表 1 に、以上と同様の方法で、14 個の各 Cys 残基を 1 つ置換することができるミスマッチプライマーセット (1 ~ 14 行目)、および近隣の 2 つまたは 3 つの Cys 残基を同時に置換するミスマッチプライマ 20 ーセット (15 ~ 17 行目) の塩基配列を示す。置換位置は置換される Cys 残基の位置 (S タンパク質アミノ酸の N 末端から数えた数) を示し、対応するプライマー (センス側とアンチセンス側との一組) のサイズと配列、および PCR 反応におけるアニーリング温度を示した。置換位置の表記は、「C/48/S」が 48 番目の Cys 残基を Ser 残基に置換

みせることを意味し、「C/76/A」が76番目のCys残基をAla残基に置換させることを意味するものとする。

(表1)

置換位置	プライマーNo.	センスプライマー	プライマーNo.	アンチセンスプライマー	サイズ(mer)	アニーリング温度(°C)
1 C/48/S	393	GCACCCACGTCTCTGGCCAAAATTTC	26	394 GAATTTCGGCAGGGAGACGGTGGTGC	26	52
2 C/65/S	444	TCACCAACCTCTAGTCCTCCAAATTG	26	445 CAAATTGGAGGACTAGAGGTGGTGA	26	53
3 C/69/S	446	CTTGTGTCCTCCAAATAAGTCTGGCTATCG	28	447 CGATAGCCAGGAGACTATTGGAGGACAAAG	28	40
4 C/76/A	520	TATCGGTGGATGGCGCTGGCGTTTATC	30	521 AAAACGCCGAGGCCATCCAGCGATAGCC	30	53
5 C/90/A	414	CATCCTGCTGCTACCCCTCATCTCTTG	28	415 CAAAGAATGAGGGCTAGCAGCAGGATG	28	55
6 C/107/A	474	ATGTTGCCGTTGGCCTCTACTTCCA	27	475 TGGAAAGTGAAGGGCACAACGGGAAACAT	27	49
7 C/121/S	476	AGCACGGGGCCTTGAAGACCTGCACGATT	30	477 GTGAGGTCTTCGAAGGGCCGTGCTGGTG	30	49
8 C/124/S	478	CCATGGAAGACCTCGACGATTCTGCT	27	479 AGCAGGAATGTCGAGGTCTTGCATGG	27	49
9 C/137/S	480	ATGTTCCCTCTAGTTGCTGTACAA	25	481 TTGTACAGCAACTAGAGGAAACAT	25	45
10 C/138/S	482	TTTCCCTCTTGCAGCTGTACAAAC	25	483 TTTGTACAGCTGCAAGAGGGAAAC	25	45
11 C/139/S	484	CTCTTGTGCTGACAAACCTTCG	26	485 CGAAGGTTTGTGAGCAACAAGAGG	26	45
12 C/147/S	486	TGGACGGAAACAGCAGCTGTATTCC	26	487 GGAATACAAGTGTGTTCGTCGA	26	53
13 C/149/A	482	CGGAAATGCAACGCCATTCCATCCCA	28	483 TGGGATGGGAATGGCCGTGCACTTCCG	28	45
14 C/221/A	464	ACCAATTCTTGGGTTGGTATAC	28	465 GTATACCCAAAGGCAAAAGAAATTGGT	28	45
15 C/147, 149/S	568	CCTTCGGACGGAAACAGCACGCCATTCCC	30	569 GGGAAATGGCUGTGTGTCCGAAAGG	30	60
16 C/138, 139/S	580	TTTCCCTCTTGTAGCTGACAAAC	25	581 GTTTGTGAGCTACAAGGGAAA	25	45
C/137, 138, 139/S	582	ATGTTCCCTCTTAGCTGACAA	25	583 TTGTCGAGCTAGAAGAGGAAACAT	25	50

また、これら 17 組 34 個のプライマーの塩基配列は、表 1 の順番どおりに配列番号 3 ~ 36 に示されている。すなわち、配列番号 1 および 2 には 48 番目の Cys 残基を 1 つ置換するプライマーセットの塩基配列が示され、以下同様に、配列番号 3 および 4 が 65 番目、配列番号 5 および 6 が 69 番目、配列番号 7 および 8 が 76 番目、配列番号 9 および 10 が 90 番目、配列番号 11 および 12 が 107 番目、配列番号 13 および 14 が 121 番目、配列番号 15 および 16 が 124 番目、配列番号 17 および 18 が 137 番目、配列番号 19 および 20 が 138 番目、配列番号 21 および 22 が 139 番目、配列番号 23 および 24 が 147 番目、配列番号 25 および 26 が 149 番目、配列番号 27 および 28 が 221 番目の Cys 残基を 1 つ置換するプライマーセットの塩基配列を示している。そして、配列番号 29 および 30 が 147, 149 番目、配列番号 31 および 32 が 138, 139 番目の Cys 残基、配列番号 33 および 34 が 137, 138, 139 番目の Cys 残基を置換するプライマーセットの塩基配列を示している。

PCR 反応は、50 μ l 中に鑄型 DNA 50 nmol、合成 DNA プライマー(変異導入プライマー)各 15 pmol、dATP 40 nmol, dCTP 40 nmol, dGTP 40 nmol, dTTP 40 nmol, Pfu turbo DNA polymerase 2.5 単位、10 mM KC1、10 mM (NH4)2SO4、20 mM Tris-Cl (pH 8.75)、2 mM MgSO4、0.1% Triton® X-100、100 μ g/ml BSA 中で、95 °C 30 秒加熱後、95 °C 30 秒、アニーリング 1 分、68 °C 20 分の反応を 18 サイクル行なった。アニーリングの温度はプライマーにより異なり、表 1 に記載したとおりとした。

反応終了後、メチル化された DNA を消化する制限酵素 DpnI (10,000

単位/mL) を $1\mu\text{l}$ 加えて 37°C で 1 時間処理した。鑄型として用いた、
Cys 残基が置換されていないプラスマミド DNA は、上記したように DNA
をメチル化する大腸菌を形質転換して得ているので、鑄型 DNA はメチ
ル化されている。一方、Cys 残基が置換されたものはメチル化されて
いない。したがって、制限酵素 DpnI 処理により、鑄型 DNA のみが消化
される。残った DNA、即ち Cys 残基が置換された L タンパク質 DNA に
より大腸菌 XL-1 Blue を形質転換し、得られたコロニーからプラ
スマミド DNA を抽出した。得られたプラスマミド DNA は、制限酵素地図およ
び塩基配列により、目的の変異が導入されていることを確認した。

また、以上のようにして作成した Cys 残基置換型 L タンパク質プラ
スマミドを鑄型として再度他のミスマッチプライマーによって PCR 反
応を行うことにより、さらに多くの Cys 残基を置換した L タンパク質
遺伝子プラスマミドを作成した。

このようにして、1 ~ 9 個の Cys 残基が改変された、27 個のプラ
スマミドを作成した。27 個のプラスマミド番号 (No.) および名前
(pB0***), その発現タンパク質における置換位置を表 2 に示した。ま
た、図 4 に HBsAg L タンパク質の 1 次構造を直線で示し、S タン
パク質におけるシステインの位置 (矢印) と、各プラスマミドの遺伝子
がコードする S タンパク質のアミノ酸置換位置 (S(セリン) または A
(アラニン) が示す位置) を図示した模式図を示した。

(表 2)

No.	プラスミド名 pBO No.	置換位置
1	454	C/48/S
2	497	C/65/S
3	498	C/69/S
4	468	C/76/A
5	455	C/90/A
6	456	C/107/A
7	460	C/121/S
8	461	C/124/S
9	465	C/137/S
10	466	C/138/S
11	467	C/139/S
12	499	C/147/S
13	469	C/149/A
14	470	C/221/A
15	511	C/76,90/A
16	514	C/90/A, C/139/S
17	518	C/90/A, C/147/S
18	513	C/90,149/A
19	512	C/90,221/A
20	519	C/76,90,221/A
21	520	C/76,90,149,221/A
22	528	C/76,90,149,221/A, C/139/S
15	23	C/76,90,149,221/A, C/147/S
24	533	C/76,90,149,221/A, C/139,147/S
25	539	C/76,90,149,221/A, C/138,139,147/S
26	540	C/76,90,149,221/A, C/137,138,139,147/S
27	541	C/76,90,149,221/A, C/107,137,138,139,147/S

(実施例 2) 変異導入 H B s A g 粒子の COS7 細胞による発現と検出

20 (1) 変異導入 H B s A g 粒子の COS7 細胞による発現

サル腎由来細胞株 COS7 をウシ胎児血清 (FBS) 5 % を含むダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM) 中で 37 °C, 5 % CO2 下で培養し、T-75 フラスコ (ファルコン社製) 1 枚あたり 4 x 106 個の細胞を得た。一方、RPMI1640 培地 10 M1 にグルコース 18.5 mg を加え、さらにこの

溶液 1 M1 に $2 \mu l$ の 50mM のジチオスレイトール (DTT) を加えた溶液を用意した。この溶液 0.3M 1 に上記の 4 × 106 個の COS7 細胞と実施例 1 で得られたプラスミド DNA $5 \mu g$ を懸濁し、エレクトロポレーションキュベット (電極間距離 4 mm) に移した後、エレクトロポレーター (バイオラッド社製) を用いて $950 \mu F$ 、0.3kV の条件で遺伝子導入を行なった。キュベット中の細胞を 60 mm ディッシュ (ファルコン社製) へ移し、5%FBS を含む DMEM 6 M1 中にて 37°C 、5%CO2 の条件下で 14 から 15 時間培養を行なった後、培地を 6 M1 の無血清培地 CHO-SFM II (インビトロジエン社製) に交換し、さらに 4 日間培養を継続して培地を回収した。

(2) 変異導入 H B s A g 粒子の抗原性による検出

回収した培地 $90 \mu l$ に 1%FBS を含むダルベッコリン酸緩衝液 (PBS) $90 \mu l$ を加えて、IMX H B s A g アッセイシステム (ダイナボット社製) により抗原性を検出した。ここで、抗原性を有している場合、H B s A g 粒子が形成されたと判断し、これにより培養液中に変異型 H B s A g 粒子の存在を確認した。図 5 にプラスミド番号 1 ~ 25 のプラスミドにより変異を導入された 25 個の変異型 H B s A g の発現を検出した結果を示した。抗原性は野生型を 100 とした場合の相対値で示しており、プラスミドによる形質転換を行わず、粒子形成が行われていない培養液を検出した結果を陰性対照 (ネガティブ) とした。なお、3 回以上行なった実験に関しては偏差値をバーで示してある。

14 個の各 Cys 残基を 1箇所置換した結果 (1 ~ 14 行目) によると、膜貫通領域に存在する Cys 残基を置換したものが良好な抗原性を有し

ていた。特に、76, 90, 149, 221 番目を置換したものが野生型と同等かそれ以上の抗原性を有していた。また、粒子外部に存在する Cys 残基でも C 末端に近い部位を置換したものは、良好な抗原性が保たれていた。特に、139, 147 番目を置換したものが野生型と同等かそれ以上の抗原性を有していた。以上の特に抗原性が良好な Cys 残基置換位置をさらに組み合わせた、2～9個の Cys 残基を置換した H B s A g L タンパク質を作成した(15～25行目)。これについては、すべて野生型と同等かそれ以上の抗原性を有していた。

(3) 変異導入 H B s A g 粒子のウェスタンプロッティングによる検出

ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (S D S - P A G E) とウェスタンプロット法 (Western Blotting) を用いて、変異型粒子分子量および二量体化した粒子の有無を検討した。

詳しくは、回収した培地 $180\ \mu l$ に IMX H B s A g アッセイシステムの抗 H B s マウスモノクローナル抗体固定化マイクロパーティクルを $60\ \mu l$ 加えて、ゆっくりチューブを回転させながら 1 晩、 $4\ ^\circ C$ においた。3 分間卓上型高速遠心機を用いてマイクロパーティクルと共に培地中の粒子を沈降させ、得られた沈殿を $0.5M\ 1$ の TBST ($10\ mM$ Tris-HCl 緩衝液 pH7.5, $150mM$ NaCl, 0.1% Tween20) を加えて懸濁し、さらに遠心を行なって沈殿を回収する洗浄操作を 5 回くり返した。

この沈殿を 2 等分して、1 つは還元条件下、もう 1 つは非還元条件下 SDS-PAGE を行なった。還元条件下とは、上記沈殿をメルカプトエタノールを加えて $95\ ^\circ C$ 、5 分間処理してから SDS-PAGE を行ったもので、システイン残基同士のジスルフィド結合は防がれ、タンパク質がポリ

マー化されていない状態で検出される。一方、非還元条件とはメルカプトエタノールを加えず熱処理もしない沈殿で SDS-PAGE を行ったもので、タンパク質はポリマー化された状態で検出される。得られた電気泳動ゲルを 1 次抗体に IMX HBsAg アッセイシステムの抗 HBs ヤギ抗体・ビオチン結合体、2 次抗体にアルカリホスファターゼ標識抗ビオチンウサギ抗体を用いてウェスタンプロッティングを行なった(図 6 (a) ~ (h))。 (a)~(d) は還元条件での結果を、(e)~(h) は非還元条件での結果を示し、レーン上の数字は Cys 置換位置を示している。これによれば、すべての変異導入 HBsAg 粒子において、還元条件では 53kDa 付近にバンドが見られ、非還元条件においては 100kDa 付近にバンドが見られた。よって、変異型 HBsAg が 53 kDa の分子量を持ち、粒子形成時には 2 量体で存在していることが確認された。 HBsAg が 2 量体で存在することは、粒子形成能と相関すると考えられる。

(実施例 3) 変異導入 HBsAg 粒子を用いた HepG2 細胞への遺伝子導入

pGLDL II P39-RcT に組み込まれた HBsAg L タンパク質をコードする遺伝子断片を、実施例 1 で作成された変異型 HBsAg 遺伝子と入れ換えて、酵母での発現のための変異型 HBsAg 遺伝子プラスミドを作成した。この変異型 HBsAg 遺伝子プラスミドの酵母による発現(粒子作成方法)は国際出願 WO 01/64930 に開示される方法に従った。

以下に、得られた変異型 HBsAg 粒子を用いて、GFP 遺伝子をヒト肝癌細胞 HepG2 に導入する方法を説明する。

まず、3.5 cmガラス底皿シャーレにヒト肝癌細胞HepG2を
1×10⁵ cells/well になるように植菌し、37°C、5%CO₂存在
下で10%ウシ胎児血清を含むD-MEMを用いて一晩培養し、指數増殖
期となるようにした。変異導入型HBsAg粒子は、緑色蛍光タンパク
5 質発現プラスミド (GFP expression plasmid pTB701-hGFP) と混合
して、間隔4mmのキュベットを使用して、110V、950μFの
条件でエレクトロポレーションを行なうことで、GFP発現プラスミ
ドを封入された。GFP発現プラスミドを包含するHBsAg粒子を
HepG2培養液へ混合し、37°C、5%CO₂存在下でD-MEM
10 を用いて4日間培養した後、HepG2内でのGFPの発現の様子を
共焦点レーザー蛍光顕微鏡にて観察した(図7(a))。比較例として、
野生型HBsAg粒子についても、同様の方法でほぼ同数のHepG
2細胞が培養されたシャーレに、等量のGFP遺伝子プラスミドを包
15 含させた粒子を等量HepG2培養液に混合し、37°C、5%CO₂
存在下でD-MEMを用いて4日間培養した後、HepG2内でのG
F Pの発現の様子を共焦点レーザー蛍光顕微鏡にて観察した(図7
(b))。

図7によると、変異導入型HBsAgによる物質導入を行った方が
蛍光を発する細胞が多く、つまり、HBsAg粒子を形成するタンパ
20 ク質に変異を導入することで、細胞に遺伝子を導入する効率が向上し
たと言える。

以上より、この発明のCys残基を置換したHBsAg粒子を用いて、
培養細胞レベルで、ヒト肝細胞に対してより高い効率で特異的に遺伝
子を導入できることが示された。

(実施例 4) Cys 残基 7 個および 8 個を変異させた変異型 H B s A g 遺伝子による、変異型 H B s A g 粒子を用いた H e p G 2 細胞への遺伝子導入

さらに、変異型 H B s A g 遺伝子のうち、7 個、または 8 個のシスティンを置換したものを使用して、H e p G 2 細胞への遺伝子導入を試みた。変異型 H B s A g 遺伝子としては、野生型の H B s A g 遺伝子のうち、76, 90, 149, 221 番目の Cys 残基を Ala 残基に置換し、138, 139, 147 番目の Cys 残基を Ser 残基に置換したプラスミド pB0 539 と、76, 90, 149, 221 番目の Cys 残基を Ala 残基に置換し、137, 139, 147 番目の Cys 残基を Ser 残基に置換したプラスミド pB0 552 と、76, 90, 149, 221 番目の Cys 残基を Ala 残基に置換し、137, 138, 139, 147 番目の Cys 残基を Ser 残基に置換したプラスミド pB0 540 とを使用した(表 3)。なお、それぞれプラスミド pB0 539、pB0 552、pB0 540 から生成される H B s A g 粒子は、それぞれ B N P - L m 7 a、B N P - L m 7 b、B N P - L m 8 と称する。

(表 3)

プラスミド	発現粒子	置換位置
pB0539	BNP-Lm7a	C/76,90,149,221/A C/138,139,147/S
pB0552	BNP-Lm7a	C/76,90,149,221/A C/137,139,147/S
pB0540	BNP-Lm8	C/76,90,149,221/A C/137,138,139,147/S

(1) 変異型 H B s A g 粒子の作製

変異型 H B s A g 粒子を得るために、エレクトロポレーション法で

COS7細胞に変異型HBsAg粒子発現ベクターDNAを導入し、4日間培養後、細胞培養上清を集め、遠心濾過濃縮し、粒子を回収した。実験操作を以下に詳しく説明する。

まず、サンプル数に合わせて、5%FCS-MEM培地でCOS7細胞を培養しておき、80%コンフルエントに達した細胞を用意する。培地を新しいものに交換し、6~8時間後にトリプシン処理して細胞を集め血球計算盤で計算した。計数後、1.5mlチューブ1本につき細胞が4×10⁶個になるように分注し遠心した。遠心条件は、30秒、12000rpmである。遠心後、上清を吸引除去し、エレクトロポレーション溶液(Epmedium:RPMI-1640+10mMグルコース+0.1mM DDT)を300μl加え細胞を懸濁した。

この細胞懸濁液に上述した表3のプラスミドDNA pB0 539、pB0 552、あるいはpB0 540を5μgを加え、氷上であらかじめ冷やしておいたキュベット(4mmギャップ)に移した。これに0.3KV、950μFの条件で電圧を印加(エレクトロポレーション)後、すぐに氷冷した。そして、キュベット内の細胞を8mlの培地に再懸濁し、6cmシャーレ2枚に二等分して播種した。

37℃で14~15時間培養した後、培地を6cmシャーレ一枚につきCHO-S-SFM II (GIBCO) 3mlに交換し、さらに4日間培養した。4日後、細胞と培養上清を別々に回収し、細胞は-20℃で保存し、培養上清は4℃で保存した。それぞれのプラスミドDNAについて4回ずつエレクトロポレーションを行った。

(2) IMxHBsAgアッセイシステムによる粒子濃度の測定
上記培養上清を用いて以下のIMxによる解析を行った。

IMxHBsAgアッセイシステム（ダイナボット社）は、サンドイッチ法を利用したEIAにより培養上清中のHBs抗原を検出する全自動イムノアッセイシステムである。これを用いて培養上清中に検出された抗原性は「RATE 値」として表現されるが、必要に応じてシステムに添付されている標準HBsAg（ヒト血清由来HBsAg粒子）が示す抗原性と比較して、発現した粒子濃度をHBsAg当量に換算した。測定試料は、培養上清90μlと1%牛胎児血清含有ダルベッコリン酸緩衝生理食塩水（希釀液）90μlを混合したものを使用した。測定する時は、常にポジティブコントロール（すなわち、標準HBsAg）と、ネガティブコントロール（すなわち、希釀液のみ）と、をセットし、検量線を作成してHBsAg当量を算出した。また、野生型HBsAg遺伝子ベクター(pB0411)を導入したCOS7細胞の培養液上清とも比較した。その結果を表4に示す。

(表4)

15

サンプル	RATE	粒子濃度(ng/ml)
ポジティブコントロール	201.1	—
ネガティブコントロール	3.6	—
野生型HBsAg粒子	94.7	132.9
BNP-Lm7a	15.7	17.7
BNP-Lm7b	15.4	17.2
BNP-Lm8	10.6	10.2

20 この結果より、粒子の標準HBsAg当量（RATE値）がBNP-Lm7aで15.7、BNP-Lm7bで15.4、BNP-Lm8で10.6と、ネガティブコントロールと比べて高い値を示しており、全ての変異導入HBsAg蛋白質が、培養上清へ分泌発現されていることが確認されたと言える。

(3) 遠心限外濾過濃縮法による濃縮

しかし、このIMxHBsAgアッセイシステムら求めたシステム置換型の粒子濃度は低く、粒子発現量が少量であるため、使用の際には濃縮する必要があると考えられる。そこで、以下に示す遠心限外濾過濃縮を行った。

5

10

培養上清16mlを遠心濾過濃縮用デバイス (Viva spin 1,000,000 MWC O、Sartorius) に移し、3500 rpm、45分、4°Cの遠心条件で液量が800μlになるまで濃縮した。800μlのうち90μl分を用いてIMxでHBsAg当量を測定し、検量線から算出された抗原量をもとに回収率を計算したところ、回収率は40%前後であった。

(4) L, S共発現粒子のIMxによるS抗原性の測定

15

20

5%FCS-MEM培地でCOS7細胞を培養しておき、80%コンフルエントに達した細胞を用意する。培地を新しいものに交換し、6~8時間後にトリプシン処理して細胞を集め、1.5mlチューブ1本につき細胞が 4×10^6 個になるように分注し遠心した。遠心条件は、30秒、12000 rpmである。遠心後、上清を吸引除去し、エレクトロポレーション溶液 (Ep medium: RPMI-1640 + 10mMグルコース + 0.1mM DDT) を300μl加え細胞を懸濁した。

この細胞懸濁液に野生型のL粒子 (HBsAg Lタンパク質からなる粒子) 発現用プラスミドDNA (pB0441) あるいはシステイン改変型のL粒子発現用プラスミドDNA 5μgと野生型S粒子 (HBsAg Sタンパク質からなる粒子) 発現用プラスミドDNA (pB0603) あ

るいはシステイン改変型の S 粒子発現用プラスミド D N A $1 \mu g$ とを同時に加え、キュベット (4 mm ギャップ) に移した。これに 0. 3 KV、950 μF の条件で電圧を印加 (エレクトロポレーション) 後、すぐに氷冷した。そして、キュベット内の細胞を 8 ml の培地に再懸濁し、6 cm シャーレ 2 枚に二等分して播種した。

37 °C で 14 ~ 15 時間培養した後、培地を 6 cm シャーレ一枚につき C H O - S - S F M II (G I B C O) 3 ml に交換し、さらに 4 日間培養した。4 日後、細胞と培養上清を別々に回収し、細胞は -20 °C で保存し、培養上清は 4 °C で保存した。培養上清の粒子濃度 (H B s A g 当量) を I M x H B s A g アッセイシステムを用いて測定した。

(表 5)

サンプル	RATE
ポジティブコントロール	255.0
ネガティブコントロール	6.2
野生型 H B s A g 粒子	363.9
B N P - L m 7 b	58
B N P - L m 8	47.6

15

20

この結果より、粒子の H B s A g 当量 (R A T E 値) が、B N P - L m 7 b で 58.0、B N P - L m 8 で 47.6 であり、変異導入 H B s A g 粒子において (2) の実験より飛躍的に高い粒子濃度 (H B s A g 当量) を示した。

(5) 変異型 H B s A g 粒子への D N A 導入

(3) で得た、濃縮した変異型 H B s A g 粒子 (B N P - L m 8) と、G F P 発現ベクター D N A 5 0 0 n g とを加え、すべてについて

全量を 500 μ l に調整した。エレクトロポレーション用 4 mm ギャップキュベット中、50 V、750 μ F でエレクトロポレーションし、5 分間室温で放置した。これにより、GFP 発現ベクターDNA が封入された変異導入HBsAg 粒子が作製された。

5 (6) GFP 発現ベクターDNA を封入した L 粒子による HepG2 細胞への遺伝子導入

6 cm シャーレ 1 枚分の HepG2 細胞をトリプシン処理して細胞を集め、血球計算盤で計数した。細胞数を確認し、8 well チャンバースライドに 9000 個/well となるように分注し、37 °C で一晩培養 10 した。この HepG2 細胞に、(5) の GFP 発現ベクターDNA を封入した変異型 HBsAg 粒子 (GFP-BNP-Lm8)、および GFP 発現ベクターDNA を封入した野生型 HBsAg 粒子を添加した。また、ポジティブコントロールとして HepG2 細胞に GFP 発現ベクターDNA と FuGene 6 (Roche 社) との複合体を添加したもの、ネ 15 ガティブコントロールとして粒子もベクターも含まないエレクトロポレーション用緩衝液のみ、あるいは GFP 発現ベクターDNA のみを添加したもの用意した。3 日後、共焦点顕微鏡で細胞の蛍光を観察した。なお、GFP 発現ベクターDNA を封入した HBsAg 粒子は、種々の割合の GFP 発現ベクターを内包したものを作製した。

20 図 8 は、その共焦点顕微鏡図を示し、各図面の上の写真が透過像であり、下の写真が蛍光像である。(a) はポジティブコントロール、(b) は粒子もベクターも含まないエレクトロポレーション用緩衝液のみのネガティブコントロール (c) は GFP 発現ベクターDNA のみのネガティブコントロール、(d) は野生型 HBsAg 粒子 (HBs

A g 粒子 (69 n g) + G F P 発現ベクターD N A (200 n g) を添加したもの、(e) はG F P - B N P - L m 8 粒子 (B N P - L m 8 (1 2 n g) + G F P 発現ベクター (2 0 0 n g)) を添加したもの、(f) はG F P - B N P - L m 8 粒子 (B N P - L m 8 (2 4 n g) + G F P 発現ベクター (2 0 0 n g) を添加したものである。

また図9は、図8を拡大した図面である。なお、図9 (a) が図8 (a) を拡大したものであり、図9 (b) が図8 (e) を拡大したものであり、図9 (c) が図8 (f) を拡大したものである。

これによれば、G F P 発現ベクターを封入した野生型粒子よりもG F P - B N P - L m 8 粒子を添加した方が細胞にはるかに強い緑色蛍光が認められ、G F P - B N P - L m 8 粒子を添加したものは、添加した粒子量が1 0 n g と少量でも蛍光を観察することができた。また、実験を繰り返し、B N P - L m 8 粒子のD N A導入効率の再現性を確認した。

15 (7) B N P - L m 8 粒子の保存性

次に、回収直後の粒子の遺伝子導入能力が長期間保持されるのかを確認するために、粒子を回収した後1週間4℃で保存したあと、G F P 発現ベクターD N Aを導入し、H e p G 2 細胞の培地中に添加して、3日後共焦点顕微鏡で蛍光を観察した。結果を図10に示す。各図面の左の写真が透過像であり、右の写真が蛍光像である。

図10は、(a) がポジティブコントロール (G F P 発現ベクターD N A (200ng) と FuGene 6 (0.5 μ l)との複合体を添加したもの)、(b) がネガティブコントロール (G F P 発現ベクターD N A 200ngのみを添加したもの)、(c) が回収直後の (左側の2つ)、または1週間後の

(右側 2 つ)、野生型 H B s A g 粒子に G F P 発現ベクターを導入して (野生型 H B s A g (W T) 6. 4 n g + G F P 発現ベクター 200 n g) 添加したもの、(d) は回収直後の (左側 2 つ)、または 1 週間後の (右側 2 つ)、B N P - L m 8 粒子に G F P 発現ベクターを導入して、(B N P - L m 8 (6. 4 n g) + G F P 発現ベクター (200 n g)) 添加したものである。

これによれば、1 週間 4 °C で保存した B N P - L m 8 粒子に G F P 発現ベクターを導入したものを添加しても、細胞に G F P 発現ベクターによる緑色の蛍光を確認することができ、G F P 発現ベクターを細胞内に良好に導入できた。つまり、B N P - L m 8 は良好な保存性を有していた。

(8) B N P - L m 8 の肝細胞特異的な遺伝子導入

また、同様の実験を H e p G 2 細胞に対して行ったもの (図 1 1) と、H e p G 2 細胞の代わりにヒト大腸ガン由来細胞 W i r D r を用いて行ったもの (図 1 2) とで比べた。ここで、図 1 1、図 1 2 の各図面の左が位相差像であり、右が蛍光像である。また、(a) はポジティブコントロール (G F P 発現ベクター D N A (200ng) と FuGene 6 (0.5 μ l) との複合体を添加したもの)、(b) はネガティブコントロール (G F P 発現ベクター D N A のみを添加したもの)、(c) は G F P 発現ベクターを内包する野生型 H B s A g 粒子 (野生型 H B s A g (W T) 14 n g + G F P 発現ベクター 200 n g) を添加したもの、(d) は G F P 発現ベクターを内包する B N P - L m 8 粒子 (B N P - L m 8 (5 n g) + G F P 発現ベクター (200 n g)) を添加したものである。

これによれば、GFP発現ベクターを内包する野生型HBsAg粒子を添加したHePG2細胞、GFP発現ベクターを内包するBNP-Lm8粒子を添加したHePG2細胞では、GFPが導入されたが、ヒト大腸ガン由来細胞WiDrには導入されなかった。したがって、BNP-Lm8粒子でもヒト肝細胞特異的な遺伝子導入が行われることが分かった。

(9) BNP-Lm8とBNP-Lm7bとの遺伝子導入効率

次に、GFP-BNP-Lm8とGFP-BNP-Lm7bにおけるGFPの細胞への導入効率を調べるために、同様の実験をGFP-BNP-Lm8を用いて行ったものと、GFP-BNP-Lm7bを用いて行ったものとで比べた(図13)。ここで、図13の(a)はポジティブコントロール(GFP発現ベクターDNA(200ng)とFuGene 6(0.5μl)との複合体を添加したもの)、(b)はネガティブコントロール(GFP発現ベクターDNAのみを添加したもの)、(c)はGFP発現ベクターDNAを内包する野生型HBsAg粒子(野生型HBsAg(WT)3.2ng+GFP発現ベクターDNA200ng)を添加したもの、(d)はGFP発現ベクターDNAを内包する野生型HBsAg粒子(野生型HBsAg(WT)6.4ng+GFP発現ベクターDNA200ng)を添加したもの、(e)はGFP発現ベクターDNAを内包するBNP-Lm8粒子(BNP-Lm8(3.2ng)+GFP発現ベクターDNA(200ng))を添加したもの、(f)はGFP発現ベクターDNAを内包するBNP-Lm7b粒子(BNP-Lm8(6.4ng)+GFP発現ベクターDNA(200ng))を添加したもの、(g)はGFP発現ベクターDNAを内包す

る BNP-Lm7b 粒子 (BNP-Lm8 (3.2 ng) + GFP 発現ベクター (200 ng) を添加したもの、(h) は GFP 発現ベクター-DNA を内包する BNP-Lm8 粒子 (BNP-Lm8 (6.4 ng) + GFP 発現ベクター (200 ng) を添加したものである。

これによれば、GFP 発現ベクター-DNA を内包する BNP-Lm7b 粒子の添加によっても細胞内に強い蛍光が観察されたが、GFP 発現ベクター-DNA を内包する BNP-Lm8 粒子の添加で、より強い蛍光が観察された。

以上の結果をまとめると、システインを置換した HBsAg 粒子、特に、BNP-Lm8 が、野生型 HBsAg 粒子より蛍光が強く観察され、ヒト肝細胞、動物細胞等の細胞への DNA 導入効率あるいは粒子内包能が高いということが分かった。さらに、肝細胞特異性も保持されていた。また、7 個のシステインを置換した BNP-Lm7b 粒子と、BNP-Lm8 とは、共に野生型粒子より蛍光が強く観察されたが、BNP-Lm8 の方が BNP-Lm7b 粒子より強い蛍光が観察された。つまり、粒子形成に不要と考えられるシステインを全て置換した BNP-Lm8 は野生型粒子よりも細胞への DNA 導入効率が高い事がわかった。

20 産業上の利用の可能性

本発明の中空ナノ粒子は、以上のように、物質を細胞特異的に運搬するという機能を保ちつつ、粒子構造を安定化し、さらに効率よく物質を細胞へ導入させることができるという効果を奏する。

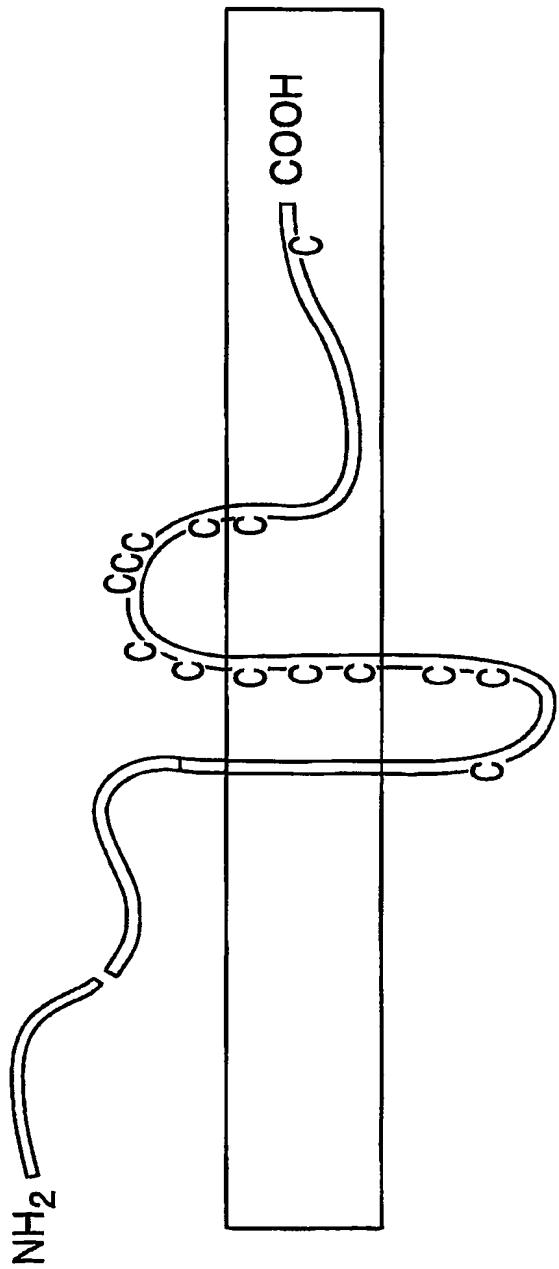
このようにして作成した薬剤は、静脈注射などといった簡便な方法

で、特定の細胞または組織に対して選択的かつ効率的に疾患治療用の細胞導入物質を送り込むことができるので、従来の遺伝子治療と大きく異なり、外科手術を必要とせず、副作用の心配も極めて低く、そのまま臨床応用可能なものである。

請求の範囲

1. 特定の細胞に対する認識能を有し、粒子形成能を有するタンパク質からなる中空ナノ粒子において、当該タンパク質に含まれる少なくとも1つのシステイン残基が改変されてなる中空ナノ粒子。
5
2. 上記タンパク質は、B型肝炎ウィルス表面抗原タンパク質である請求項1記載の中空ナノ粒子。
3. 膜貫通領域に存在する少なくとも1つのシステイン残基が疎水性アミノ酸に置換され、及び／又は、粒子外部または内部に存在する少なくとも1つのシステイン残基が親水性アミノ酸に置換されている請求項1または2記載の中空ナノ粒子。
10
4. 膜貫通領域に存在する少なくとも1つのシステイン残基がアラニン残基に置換され、及び／又は、粒子外部または内部に存在する少なくとも1つのシステイン残基がセリン残基に置換されている請求項3記載の中空ナノ粒子。
15
5. 上記B型肝炎ウィルス表面抗原タンパク質の、Sタンパク質アミノ酸配列におけるN末端部分から数えて76, 90, 139, 147, 149, 221番目のシステイン残基が置換され、かつ、137, 138番目のシステイン残基から選ばれる少なくとも1つが置換されている請求項2～4の何れか1項に記載の中空ナノ粒子。
20
6. 上記システイン残基の改変は、上記粒子形成能を有するタンパク質をコードする遺伝子に変異を導入し、この変異遺伝子を発現させることにより行われることを特徴とする請求項1～5の何れか1項に記載の中空ナノ粒子。

7. 上記変異遺伝子を含むベクターにて真核細胞を形質転換させ、当該真核細胞において上記変異遺伝子を発現させることにより得られることを特徴とする請求項 6 記載の中空ナノ粒子。
8. 上記真核細胞は、動物細胞または酵母であることを特徴とする請求項 7 記載の中空ナノ粒子。
5
9. 請求項 1 ~ 8 の何れか 1 項に記載の中空ナノ粒子に細胞導入物質が封入されていることを特徴とする薬剤。
10. 上記細胞導入物質は、遺伝子であることを特徴とする請求項 9 記載の薬剤。
10
11. 請求項 9 または 10 に記載の薬剤を用いる疾患の治療方法。



1
図

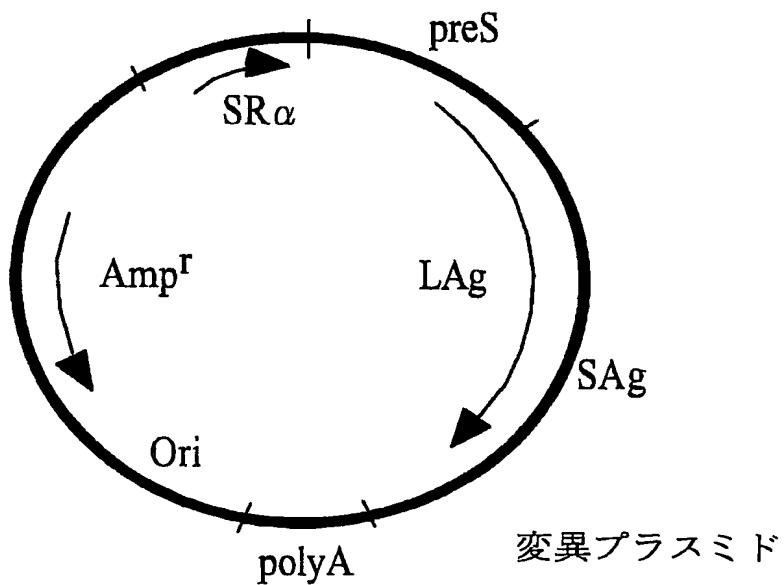
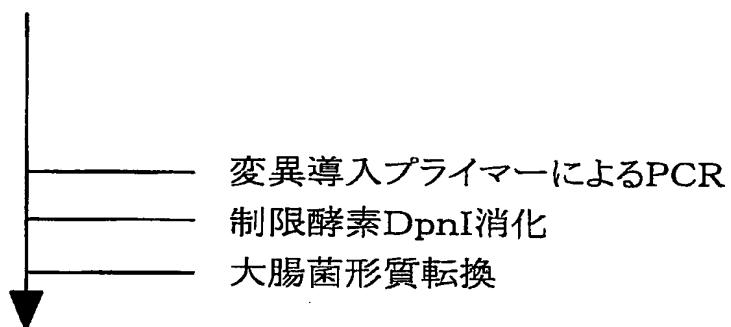
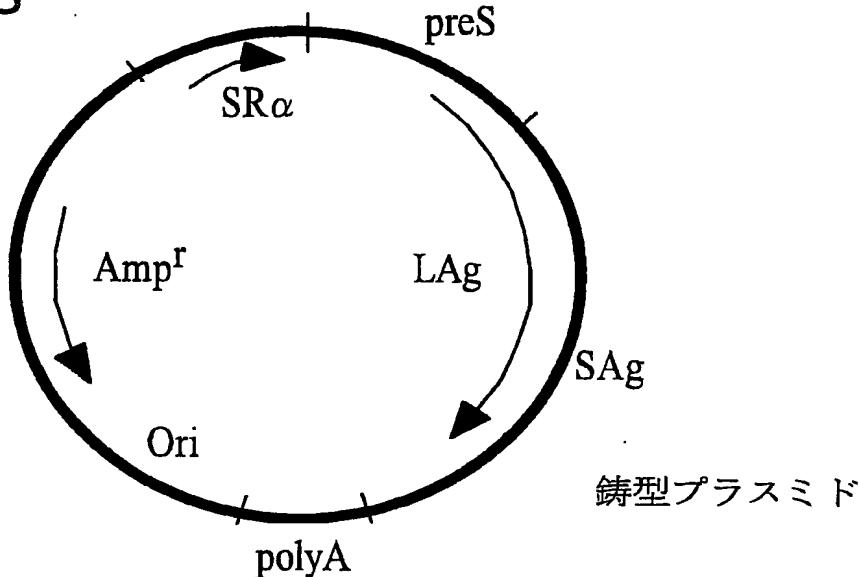
mrsllivlc fplalaalGV RQGMGTMLSV PNPILGFFPDH QLDPAFGANS NNPDDDFNPN	60
secretion signal	PreS1
KDQWPEANQV GAGAFCGPQFT PPHGGLLGWS PQQAGQILTV PAAPPAPASTN RQSGRQPTPI	120
<u> </u>	
SPPLRDSHPQ AMQMNSTTFH QALIDPRVRG LFIFPAGGSSS GTVNPVPTTA SPISGDPAPN	180
SPPLRDSHPQ AMQMNSTTFH QALIDPRVRG LFIFPAGGSSS GTVNPVPTTA SPISGDPAPN	180
PreS2	*
MENTTSFIG PIIIVLQAGFF IITRITIIPQ SIDSWTTSIN FIGGGAPTCTPG QMSQSQPTSNNH	240
*	*
SPTSCPPICR GYRMWCLRRE IITFLFILLC IITHLVLLDY QGMLPVCPLL PGTSTTSTGP	300
*	*
CKTCTIPAQG TSMFPSCCCT KPSDGMCTCI PIPSSWAFAF FILMENASVRF SWLSSLVLPFV	360
*	*
QWFVGLSPTV WLSVIVMMWY WGPSLYNVLIS PFLPLLPFF CIWWVI	406

☒ 2

Met Glu Asn Thr Thr Ser Gly Phe Leu Gly Pro Leu Leu Val Leu Gln
1
Ala Gly Phe Phe Leu Leu Thr Arg Ile Leu Thr Ile Pro Gln Ser Leu
Asp Ser Trp Trp Thr Ser Leu Asn Phe Leu Gly Gly Ala Pro Thr Cys
48
Pro Gly Gln Asn Ser Gln Ser Pro Thr Ser Asn His Ser Pro Thr Ser
Cys Pro Pro Ile Cys Pro Gly Tyr Arg Trp Met Cys Leu Arg Arg Phe
65 69 76
Ile Ile Phe Leu Phe Ile Leu Leu Cys Leu Ile Phe Leu Leu Val
90
Leu Leu Asp Tyr Gln Gly Met Leu Pro Val Cys Pro Leu Leu Pro Gly
107
Thr Ser Thr Thr Ser Thr Gly Pro Cys Lys Thr Cys Thr Ile Pro Ala
121 124
Gln Gly Thr Ser Met Phe Pro Ser Cys Cys Cys Thr Lys Pro Ser Asp
137 138 139
Gly Asn Cys Thr Cys Ile Pro Ile Pro Ser Ser Trp Ala Phe Ala Arg
147 149
Phe Leu Trp Glu Trp Ala Ser Val Arg Phe Ser Trp Leu Ser Leu Leu
Val Pro Phe Val Gln Trp Phe Val Gly Leu Ser Pro Thr Val Trp Leu
Ser Val Ile Trp Met Met Trp Tyr Trp Gly Pro Ser Leu Tyr Asn Ile
Leu Ser Pro Phe Leu Pro Leu Leu Pro Ile Phe Phe Cys Leu Trp Val
221
Tyr Ile
226

3/13

図 3



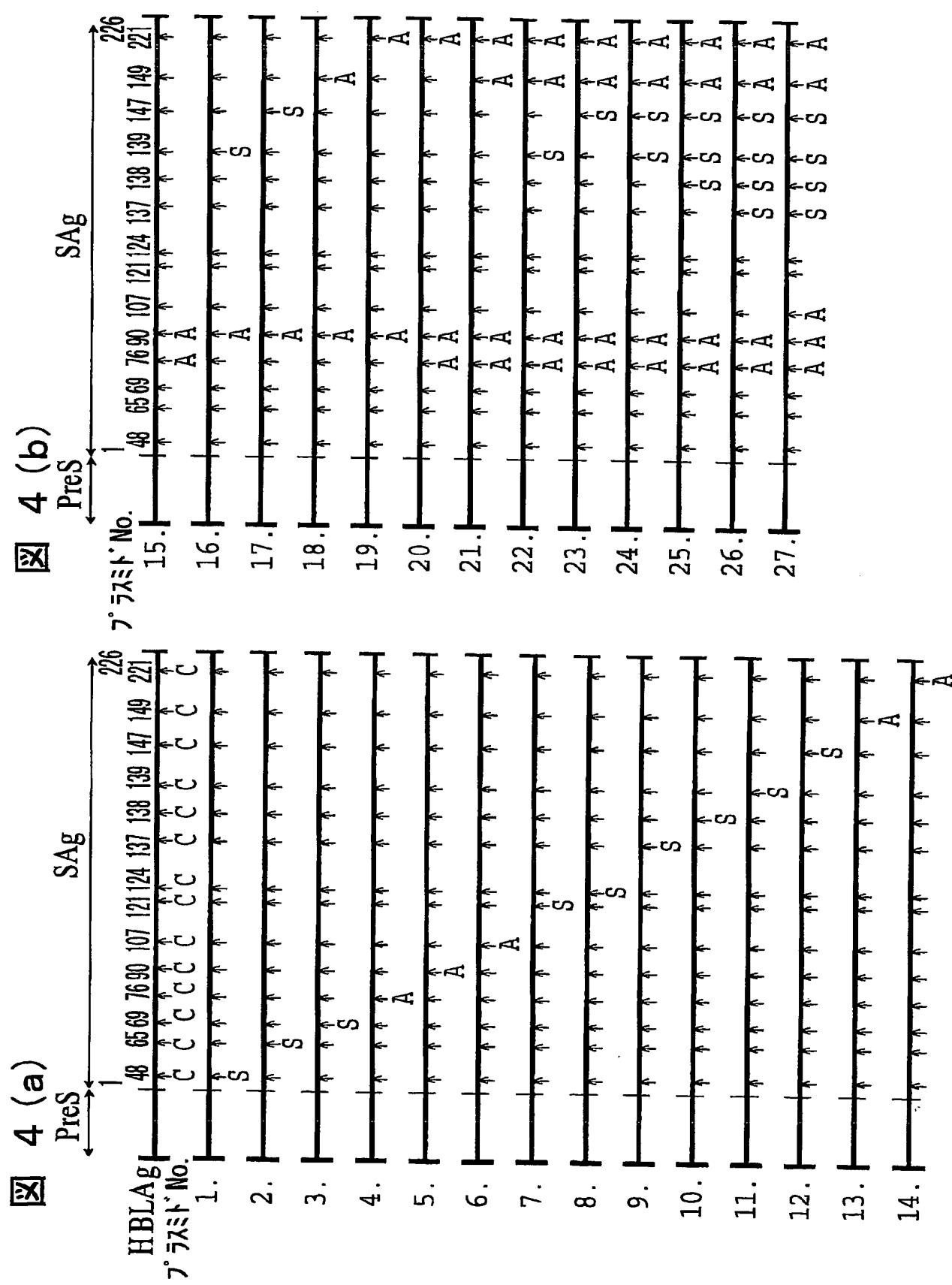
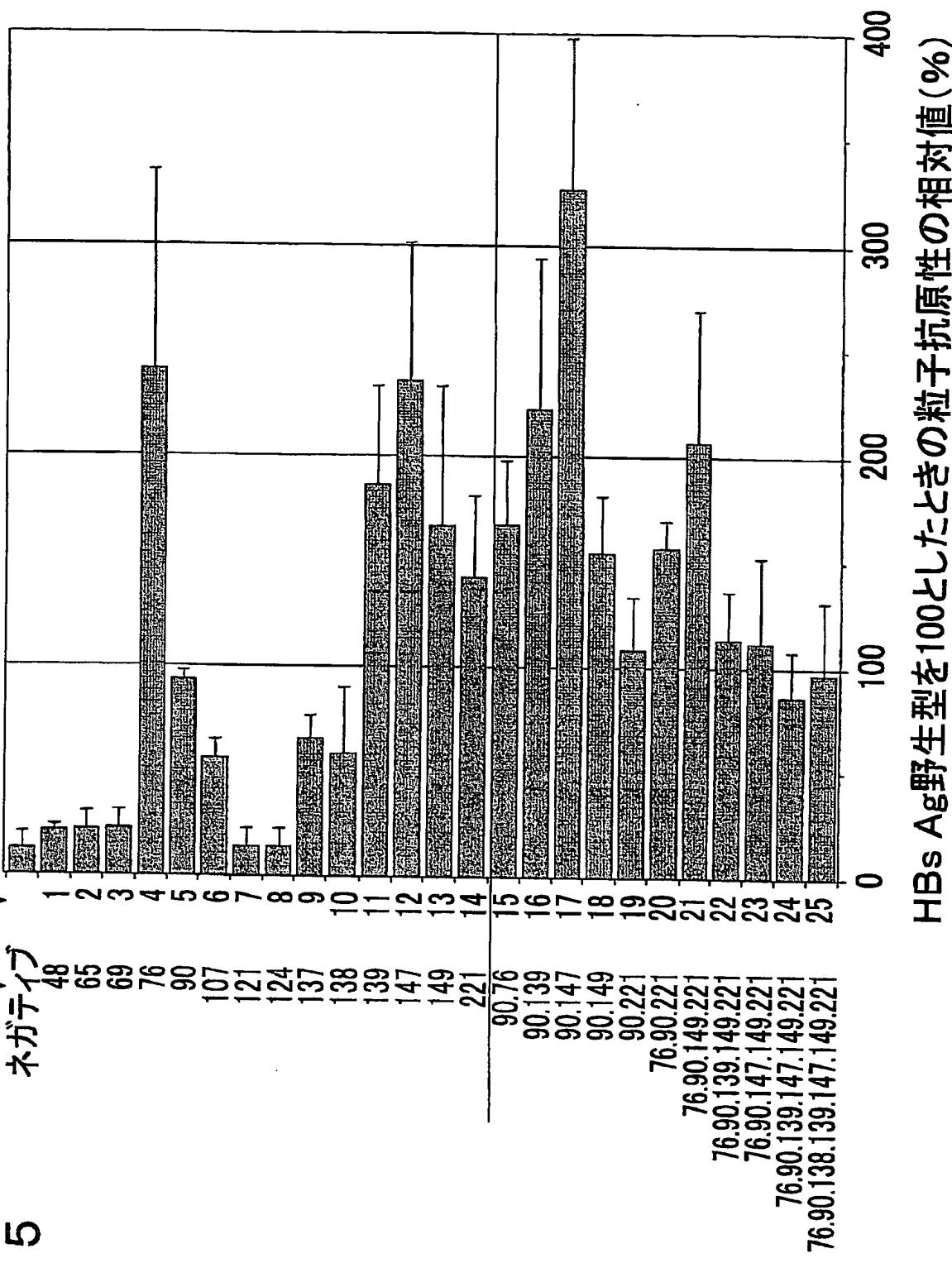
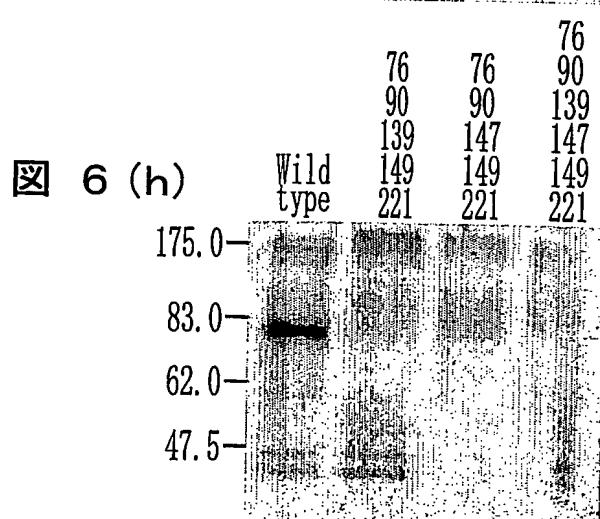
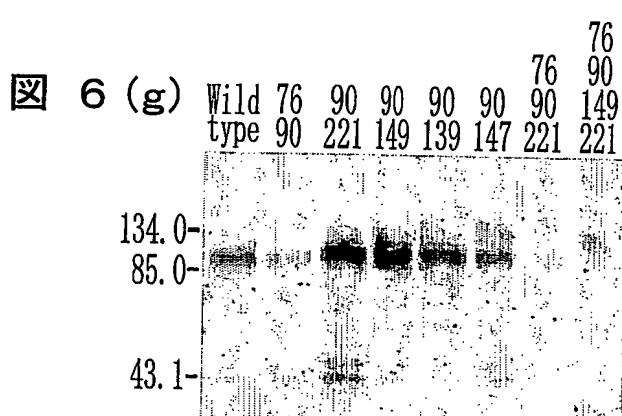
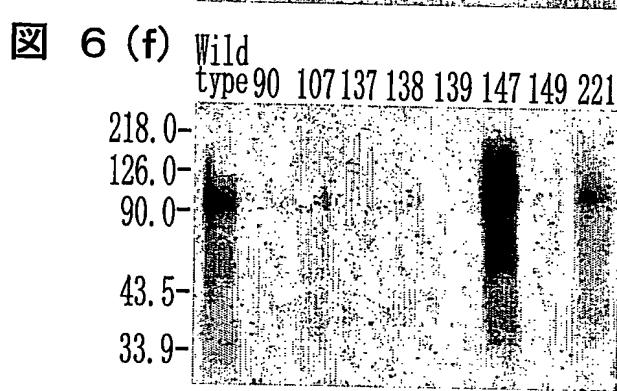
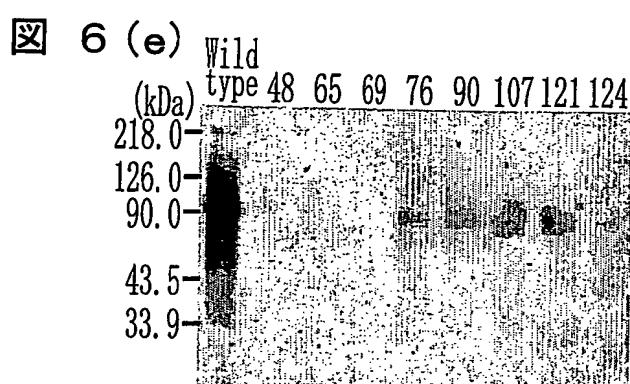
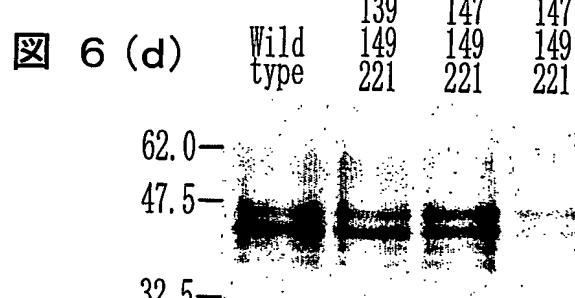
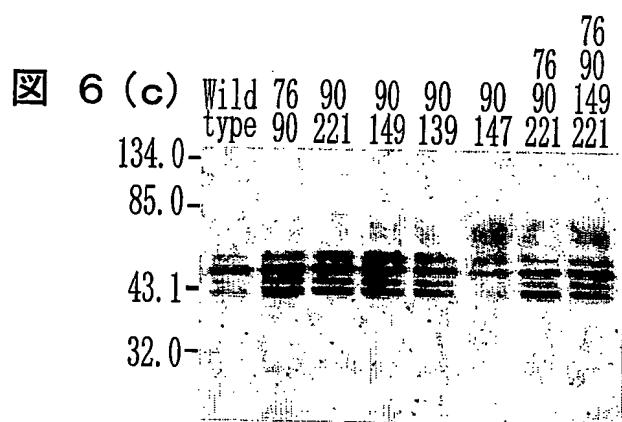
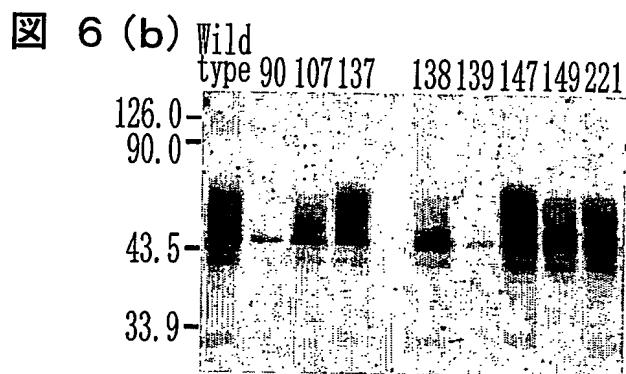
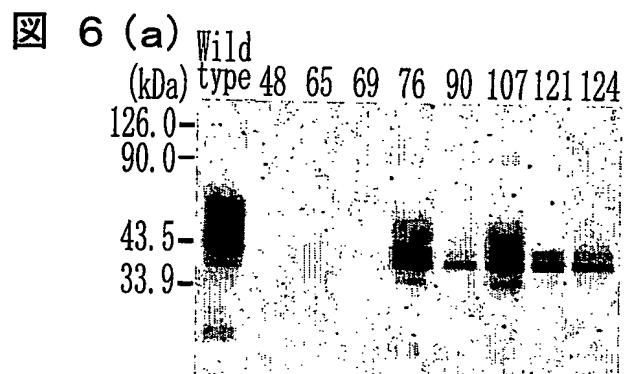


図 5
置換位置
ネガティブ
→ 使用したプラスミドNo.



6/13



7/13

図 7 (b)

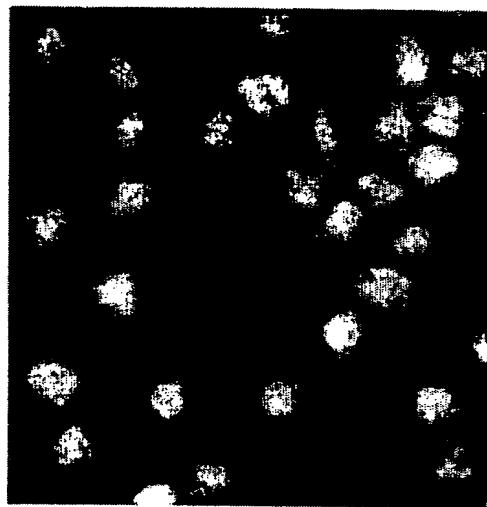
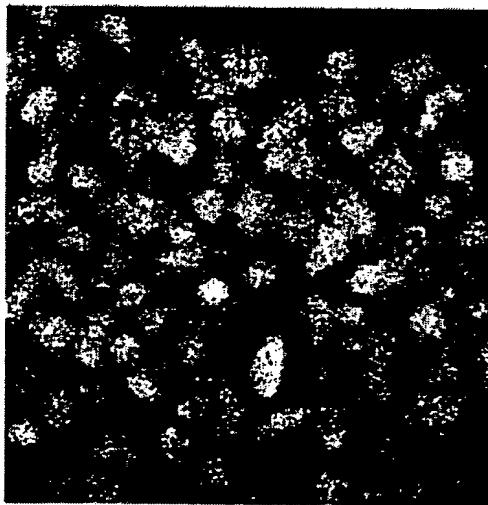


図 7 (a)



8/13

図 8 (a)

ポジティブコントロール

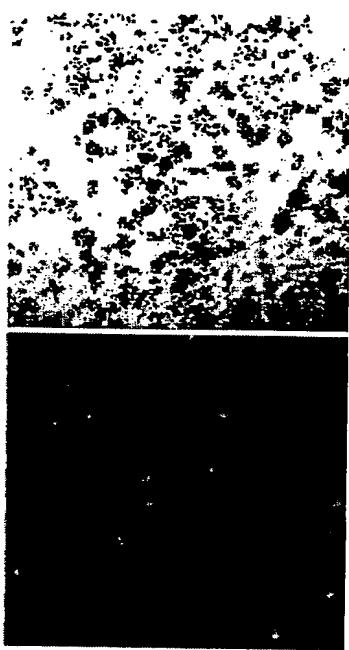


図 8 (b)

ネガティブコントロール

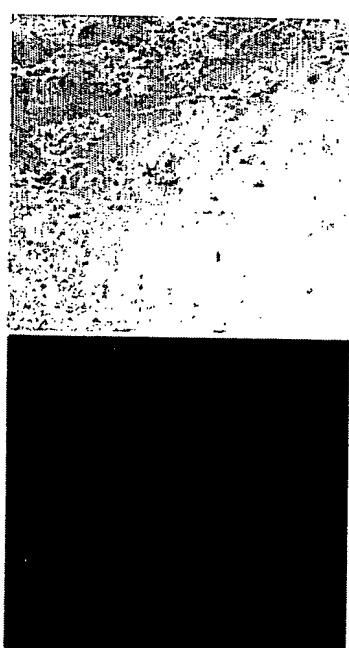


図 8 (c)

ネガティブコントロール

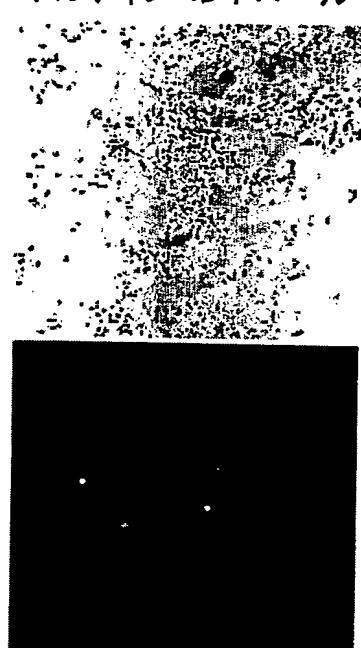


図 8 (d)

WT(69ng)+GFP(200ng)

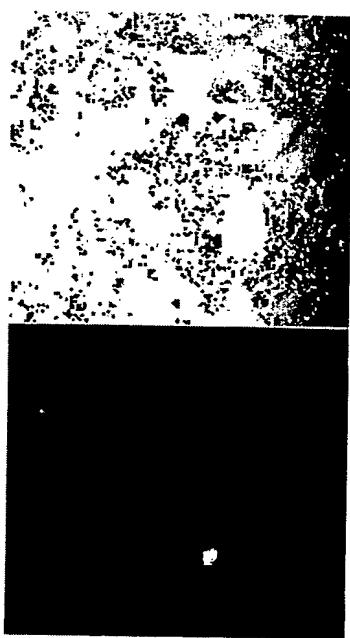


図 8 (e)

BNp-Lm8(12ng)+GFP(200ng)

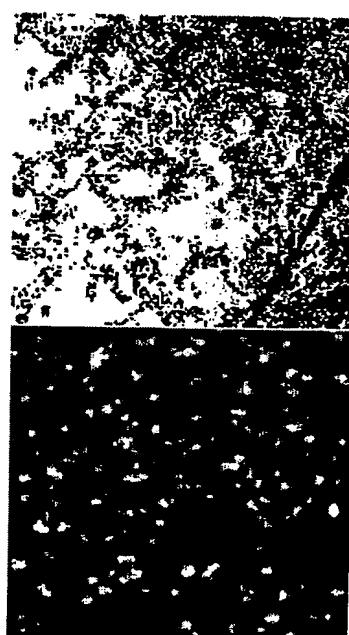
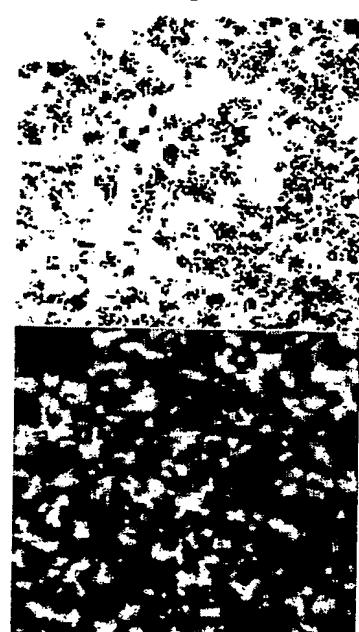


図 8 (f)

BNP-Lm8(24ng)+GFP(200ng)



9/13

図 9 (a)
ポジティブコントロール



図 9 (b)
BNP-LM8(12ng)+GFP(100ng)



図 9 (c)
BNP-Lm8(24ng)+GFP(200ng)



BEST AVAILABLE COPY

図 10 (a)
ポジティブコントロール

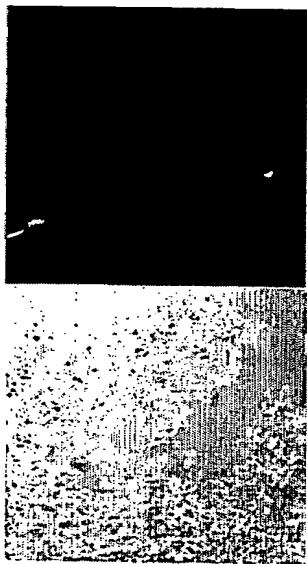


図 10 (b)
ネガティブコントロール

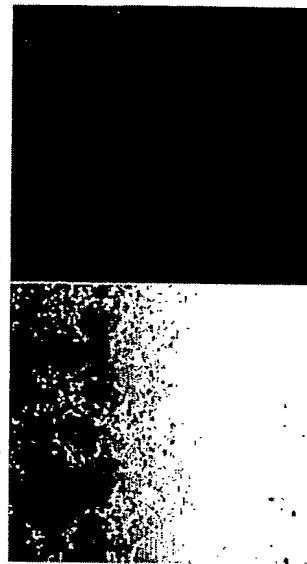
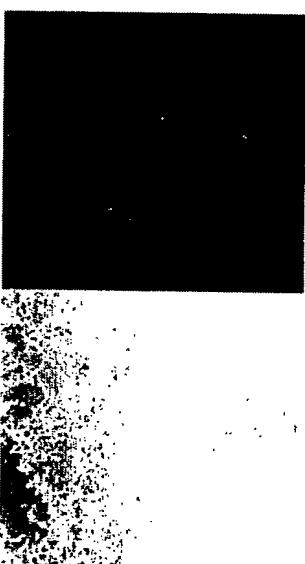
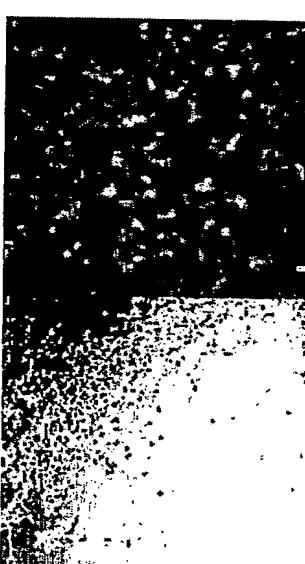


図 10 (c)
WT(6. 4ng) + GFP(200ng)



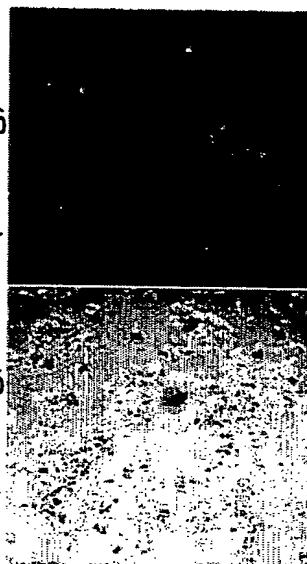
1週間後
→

図 10 (d)
BNP-Lm8(6. 4ng) + GFP(200ng)

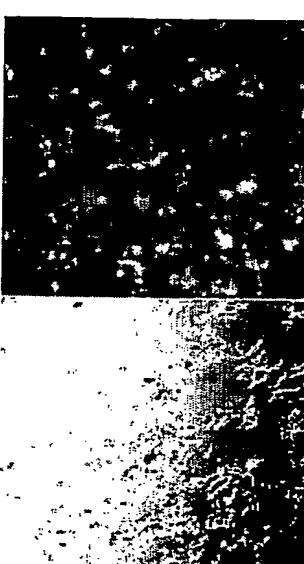


1週間後
→

WT(6. 4ng) + GFP(200ng)



BNP-Lm8(6. 4ng) + GFP(200ng)



11/13

図 11 (a) ポジティブコントロール

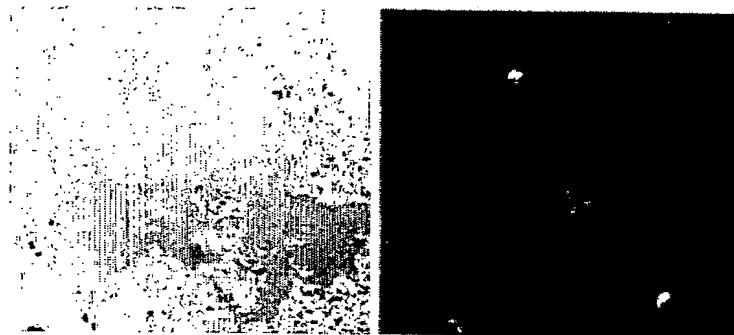


図 11 (b) ネガティブコントロール



図 11 (c) WT(14ng)+GFP(200ng)

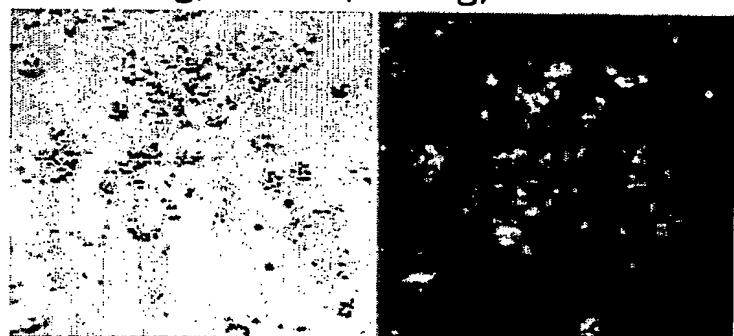
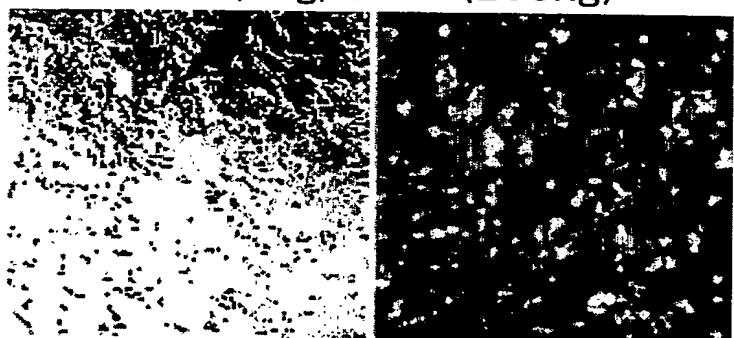


図 11 (d) BNP-Lm8(5ng)+GFP(200ng)



12/13

図 12 (a) ポジティブコントロール



図 12 (b) ネガティブコントロール



図 12 (c) WT(14ng)+GFP(200ng)

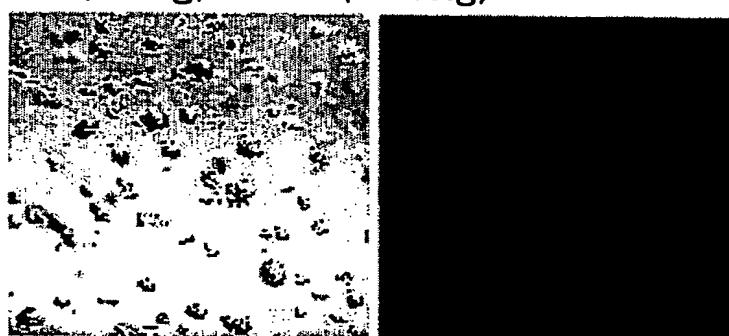


図 12 (d) BNP-Lm8(5ng)+GFP(200ng)



13/13

図 13 (a)
ポジティブコントロール



図 13 (b)
ネガティブコントロール

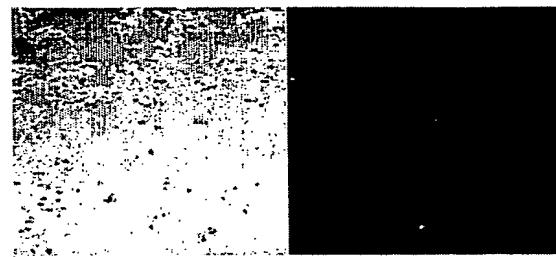


図 13 (c)
WT(3.2ng)+GFP(200ng)

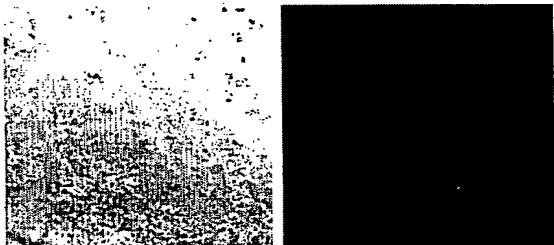


図 13 (d)
WT(6.4ng)+GFP(200ng)

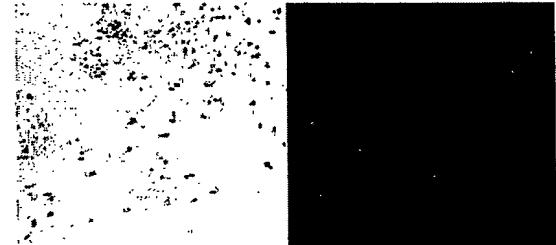


図 13 (e)
BNP-Lm7b(3.2ng)+GFP(200ng)

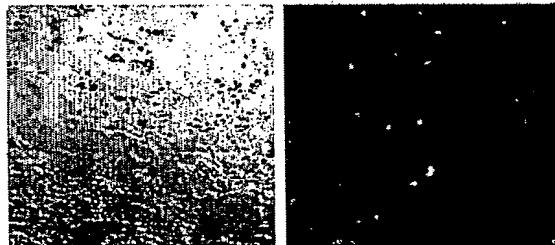


図 13 (f)
BNP-Lm7b(6.4ng)+GFP(200ng)

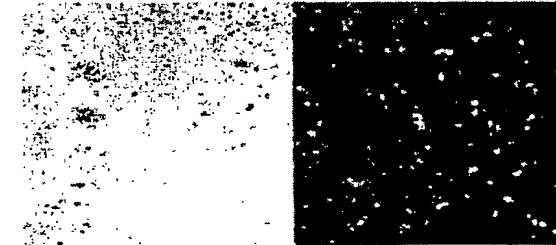


図 13 (g)
BNP-Lm8(3.2ng)+GFP(200ng)

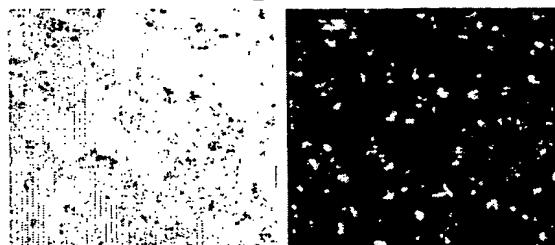
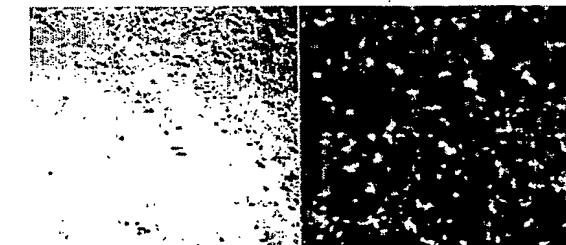


図 13 (h)
BNP-Lm8(6.4ng)+GFP(200ng)



SEQUENCE LISTING

<110> Japan Science and Technology Corporation

<120> Hollow nano-particles composed of cysteine-modified proteins, and their use as a therapeutic drug

<130> P023P05

<150> JP2002-191386

<151> 2002-6-28

<150> JP2003-183863

<151> 2003-6-27

<160> 36

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 1218

<212> DNA

<213> Hepatitis B virus

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1218)

<400> 1

atg aga tct ttg atc ttg gtt ttg tgt ttc ttg cca ttg gct gct 48
Met Arg Ser Leu Leu Ile Leu Val Leu Cys Phe Leu Pro Leu Ala Ala

1

5

10

15

ttg ggt aag gtt cga caa ggc atg ggg acg aat ctt tct gtt ccc aat 96
Leu Gly Lys Val Arg Gln Gly Met Gly Thr Asn Leu Ser Val Pro Asn

2/19

20

25

30

cct ctg gga ttc ttt ccc gat cac cag ttg gac cct gcg ttc gga gcc 144
Pro Leu Gly Phe Phe Pro Asp His Gln Leu Asp Pro Ala Phe Gly Ala
35 40 45

aac tca aac aat cca gat tgg gac ttc aac ccc aac aag gat caa tgg 192
Asn Ser Asn Asn Pro Asp Trp Asp Phe Asn Pro Asn Lys Asp Gln Trp
50 55 60

cca gag gca aat cag gta gga gcg gga gca ttc ggg cca ggg ttc acc 240
Pro Glu Ala Asn Gln Val Gly Ala Gly Ala Phe Gly Pro Gly Phe Thr
65 70 75 80

cca cca cac ggc ggt ctt ttg ggg tgg agc cct cag gct cag ggc ata 288
Pro Pro His Gly Gly Leu Leu Gly Trp Ser Pro Gln Ala Gln Gly Ile
85 90 95

ttg aca aca gtg cca gca gca cct cct cct gcc tcc acc aat cgg cag 336
Leu Thr Thr Val Pro Ala Ala Pro Pro Ala Ser Thr Asn Arg Gln
100 105 110

tca gga aga cag cct act ccc atc tct cca cct cta aga gac agt cat 384
Ser Gly Arg Gln Pro Thr Pro Ile Ser Pro Pro Leu Arg Asp Ser His
115 120 125

cct cag gcc atg cag tgg aat tcc aca aca ttc cac caa gct ctg cta 432
Pro Gln Ala Met Gln Trp Asn Ser Thr Thr Phe His Gln Ala Leu Leu
130 135 140

gat ccc aga gtg agg ggc cta tat ttt cct gct ggt ggc tcc agt tcc 480
Asp Pro Arg Val Arg Gly Leu Tyr Phe Pro Ala Gly Gly Ser Ser Ser
145 150 155 160

gga aca gta aac cct gtt ccg act act gcc tca ccc ata tct ggg gac 528
Gly Thr Val Asn Pro Val Pro Thr Thr Ala Ser Pro Ile Ser Gly Asp

3/19

165

170

175

cct gca ccg aac atg gag aac aca aca tca gga ttc cta gga ccc ctg 576
Pro Ala Pro Asn Met Glu Asn Thr Thr Ser Gly Phe Leu Gly Pro Leu
180 185 190

ctc gtg tta cag gcg ggg ttt ttc ttg ttg aca aga atc ctc aca ata 624
Leu Val Leu Gln Ala Gly Phe Phe Leu Leu Thr Arg Ile Leu Thr Ile
195 200 205

cca cag agt cta gac tcg tgg tgg act tct ctc aat ttt cta ggg gga 672
Pro Gln Ser Leu Asp Ser Trp Trp Thr Ser Leu Asn Phe Leu Gly Gly
210 215 220

gca ccc acg tgt cct ggc caa aat tcg cag tcc cca acc tcc aat cac 720
Ala Pro Thr Cys Pro Gly Gln Asn Ser Gln Ser Pro Thr Ser Asn His
225 230 235 240

tca cca acc tct tgt cct cca att tgt cct ggc tat cgc tgg atg tgt 768
Ser Pro Thr Ser Cys Pro Pro Ile Cys Pro Gly Tyr Arg Trp Met Cys
245 250 255

ctg cgg cgt ttt atc ata ttc ctc ttc atc ctg ctg cta tgc ctc atc 816
Leu Arg Arg Phe Ile Ile Phe Leu Phe Ile Leu Leu Leu Cys Leu Ile
260 265 270

ttc ttg ttg gtt ctt ctg gac tac caa ggt atg ttg ccc gtt tgt cct 864
Phe Leu Leu Val Leu Leu Asp Tyr Gln Gly Met Leu Pro Val Cys Pro
275 280 285

cta ctt cca gga aca tca acc acc agc acg ggg cca tgc aag acc tgc 912
Leu Leu Pro Gly Thr Ser Thr Ser Thr Gly Pro Cys Lys Thr Cys
290 295 300

acg att cct gct caa gga acc tct atg ttt ccc tct tgt tgc tgt aca 960
Thr Ile Pro Ala Gln Gly Thr Ser Met Phe Pro Ser Cys Cys Cys Thr

4/19

305 310 315 320

aaa cct tcg gac gga aac tgc act tgt att ccc atc cca tca tcc tgg 1008
Lys Pro Ser Asp Gly Asn Cys Thr Cys Ile Pro Ile Pro Ser Ser Trp

325 330 335

gct ttc gca aga ttc cta tgg gag tgg gcc tca gtc cgt ttc tcc tgg 1056
Ala Phe Ala Arg Phe Leu Trp Glu Trp Ala Ser Val Arg Phe Ser Trp
340 345 350ctc agt tta cta gtg cca ttt gtt cag tgg ttc gta ggg ctt tcc ccc 1104
Leu Ser Leu Leu Val Pro Phe Val Gln Trp Phe Val Gly Leu Ser Pro
355 360 365act gtt tgg ctt tca gtt ata tgg atg atg tgg tat tgg ggg cca agt 1152
Thr Val Trp Leu Ser Val Ile Trp Met Met Trp Tyr Trp Gly Pro Ser
370 375 380ctg tac aac atc ttg agt ccc ttt tta cct cta tta cca att ttc ttt 1200
Leu Tyr Asn Ile Leu Ser Pro Phe Leu Pro Leu Leu Pro Ile Phe Phe
385 390 395 400tgt ctt tgg gta tat att 1218
Cys Leu Trp Val Tyr Ile
405

<210> 2

<211> 406

<212> PRT

<213> Hepatitis B virus

<400> 2

Met Arg Ser Leu Leu Ile Leu Val Leu Cys Phe Leu Pro Leu Ala Ala

1 5 10 15

5/19

Leu Gly Lys Val Arg Gln Gly Met Gly Thr Asn Leu Ser Val Pro Asn
20 25 30

Pro Leu Gly Phe Phe Pro Asp His Gln Leu Asp Pro Ala Phe Gly Ala
35 40 45

Asn Ser Asn Asn Pro Asp Trp Asp Phe Asn Pro Asn Lys Asp Gln Trp
50 55 60

Pro Glu Ala Asn Gln Val Gly Ala Gly Ala Phe Gly Pro Gly Phe Thr
65 70 75 80

Pro Pro His Gly Gly Leu Leu Gly Trp Ser Pro Gln Ala Gln Gly Ile
85 90 95

Leu Thr Thr Val Pro Ala Ala Pro Pro Ala Ser Thr Asn Arg Gln
100 105 110

Ser Gly Arg Gln Pro Thr Pro Ile Ser Pro Pro Leu Arg Asp Ser His
115 120 125

Pro Gln Ala Met Gln Trp Asn Ser Thr Thr Phe His Gln Ala Leu Leu
130 135 140

Asp Pro Arg Val Arg Gly Leu Tyr Phe Pro Ala Gly Gly Ser Ser Ser
145 150 155 160

Gly Thr Val Asn Pro Val Pro Thr Thr Ala Ser Pro Ile Ser Gly Asp
165 170 175

Pro Ala Pro Asn Met Glu Asn Thr Thr Ser Gly Phe Leu Gly Pro Leu
180 185 190

Leu Val Leu Gln Ala Gly Phe Phe Leu Leu Thr Arg Ile Leu Thr Ile
195 200 205

6/19

Pro Gln Ser Leu Asp Ser Trp Trp Thr Ser Leu Asn Phe Leu Gly Gly
210 215 220

Ala Pro Thr Cys Pro Gly Gln Asn Ser Gln Ser Pro Thr Ser Asn His
225 230 235 240

Ser Pro Thr Ser Cys Pro Pro Ile Cys Pro Gly Tyr Arg Trp Met Cys
245 250 255

Leu Arg Arg Phe Ile Ile Phe Leu Phe Ile Leu Leu Leu Cys Leu Ile
260 265 270

Phe Leu Leu Val Leu Leu Asp Tyr Gln Gly Met Leu Pro Val Cys Pro
275 280 285

Leu Leu Pro Gly Thr Ser Thr Ser Thr Gly Pro Cys Lys Thr Cys
290 295 300

Thr Ile Pro Ala Gln Gly Thr Ser Met Phe Pro Ser Cys Cys Cys Thr
305 310 315 320

Lys Pro Ser Asp Gly Asn Cys Thr Cys Ile Pro Ile Pro Ser Ser Trp
325 330 335

Ala Phe Ala Arg Phe Leu Trp Glu Trp Ala Ser Val Arg Phe Ser Trp
340 345 350

Leu Ser Leu Leu Val Pro Phe Val Gln Trp Phe Val Gly Leu Ser Pro
355 360 365

Thr Val Trp Leu Ser Val Ile Trp Met Met Trp Tyr Trp Gly Pro Ser
370 375 380

Leu Tyr Asn Ile Leu Ser Pro Phe Leu Pro Leu Leu Pro Ile Phe Phe
385 390 395 400

Cys Leu Trp Val Tyr Ile

405

<210> 3

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 3

gcacccacgt ctcctggcca aaattc

26

<210> 4

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 4

gaattttggc caggagacgt gggtgc

26

<210> 5

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

8/19

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 5

tcaccaacct ctagtcctcc aatttg

26

<210> 6

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 6

caaattggag gactagaggt tggtga

26

<210> 7

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 7

cttgcctcc aataagtctt ggctatcg

28

<210> 8

<211> 28

9/19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 8

cgatagccag gacttattgg aggacaag

28

<210> 9

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 9

tatcgctgga tggcgctgcg gcgttttac

30

<210> 10

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 10

aaaacgccgc agcgccatcc agcgatagcc

30

<210> 11
<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 11
catcctgctg ctaccctca tcttcttg

28

<210> 12
<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 12
caagaagatg agggctagca gcaggatg

28

<210> 13
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

11/19

<400> 13

atgttgcggc ttgcgcctct acttcca

27

<210> 14

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 14

tggaaagttaga ggcgcaacgg gcaacat

27

<210> 15

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 15

agcacggggc cttcgaagac ctgcacgatt

30

<210> 16

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

12/19

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 16

gtgcagggtct tcgaaggccc cgtgctggtg

30

<210> 17

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 17

ccatgcaaga cctcgacgat tcctgct

27

<210> 18

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 18

agcaggaatc gtcgagggtct tgcatgg

27

<210> 19

<211> 25

<212> DNA

13/19

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 19

atgtttccct ctagttgctg tacaa

25

<210> 20

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 20

ttgtacagca actagaggga aacat

25

<210> 21

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 21

tttccctttt gcagctgtac aaaac

25

14/19

<210> 22

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 22

ttttgtacag ctgcaagagg gaaac

25

<210> 23

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 23

cctcttggc ctcgacaaaa ccttcg

26

<210> 24

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 24

cgaaggaaaa gtcgagcaac aagagg

26

<210> 25

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 25

tcggacggaa acagcacttg tattcc

26

<210> 26

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 26

ggaataacaag tgctgtttcc gtccga

26

<210> 27

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially

Synthesized Primer Sequence**<400> 27**

cgaaaaactgc acggccattc ccatccca

28**<210> 28****<211> 28****<212> DNA****<213> Artificial Sequence****<220>****<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence****<400> 28**

tgggatggga atggccgtgc agtttccg

28**<210> 29****<211> 28****<212> DNA****<213> Artificial Sequence****<220>****<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence****<400> 29**

accaatttgc ttgcgcgtt gggtatac

28**<210> 30****<211> 28****<212> DNA****<213> Artificial Sequence**

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 30

gtatacccaa agcgcaaaga aaatttgt

28

<210> 31

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 31

ccttcggacg gaaacagcac ggccattccc

30

<210> 32

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 32

gggaatggcc gtgctgttcc cgtccgaagg

30

<210> 33

<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 33
tttccctctt gtagctcgac aaaac

25

<210> 34
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 34
gttttgtcga gtcataagag ggaaa

25

<210> 35
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 35
atgtttccct cttcttagctc gacaa

25

<210> 36

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 36

ttgtcgagct agaagaggga aacat

25

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/08244

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ A61K9/51, A61K47/42, A61K48/00, A61P1/16, A61P35/00,
A61P43/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ A61K9/51, A61K47/42, A61K48/00, A61P1/16, A61P35/00,
A61P43/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
CAPplus (STN), BIOSIS (STN), MEDLINE (STN), EMBASE (STN), WPI, JOIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 919568 A1 (SORIN DIAGNOSIS S R L),	1-4, 6-8
Y	02 June, 1999 (02.06.99),	9, 10
A	& US 6172193 A & JP 11-253184 A	5
X	MANGOLD, C.M. et al., 'Analysis of intermolecular disulfide bonds and free sulfhydryl groups in hepatitis B surface antigen particles.', Arch. Virol., 1997, Vol.142, No.11, pages 2257 to 2267	1-8
Y		9, 10
X	PRANGE, R. et al., 'Mutational analysis of HBsAg assembly.', Intervirology, 1995, Vol.38, No.1-2, pages 16 to 23	1-8
Y		9, 10
X	MANGOLD, C.M. et al., 'Secretion and antigenicity of hepatitis Bvirus small envelope proteins lacking cysteines in the major antigenic region.', Virology, 1995, Vol.211, No.2, pages 535 to 543	1-8
Y		9, 10

Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
17 October, 2003 (17.10.03)

Date of mailing of the international search report
11 November, 2003 (11.11.03)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/08244

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	BRUCE S.A. et al., 'Mutations of some critical amino acid residues in the hepatitis B virus surface antigen.', J.Med.Viro., 1995, Vol.46, No.2, pages 157 to 161	1-4,6-8 9,10 5
X	ANTONI, B.A. et al., 'Site-directed mutagenesis of cysteine residues of hepatitis B surface antigen.', Analysis of two single mutants and the double mutant.', Eur.J.Biochem., 1994, Vol.222, No.1, pages 121 to 127	1-4,6-8 9,10 5
X	MANGOLD, C.M. et al., 'Mutational analysis of the cysteine residues in the hepatitis B virus small envelope protein.', J.Viro., 1993, Vol.67, No.8, pages 4588 to 4597	1-8 9,10
X	ASHTON-RICKARDT, P.G. et al., 'Mutants of the hepatitis B virus surface antigen that define some antigenically essential residues in the immunodominant a region.', J.Med.Viro., 1989, Vol.29, No.3, pages 196 to 203	1-4,6-8 9,10 5
Y	WO 01/64930 A1 (JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY CORP.), 07 September, 2001 (07.09.01), & EP 1262555 A1 & JP 2001-316298 A	9,10
Y	IWASAKI, UEDA et al., 'HbsAg L ryushi o Mochiita Hito Kansaibo ni Taisuru GFP Idenshi Donyuho no Kisoteki Kenkyu', Journal of Japan Surgical Society, 10 March, 2002 (10.03.02), Vol.103, special extra issue, page 597, PP1159	9,10
P, Y	SENOO, KURODA et al 'Bio Nano Ryushi o Mochiiru Idenshi-Yakuza no Pinpoint Drug Delivery System', BIO INDUSTRY, 12 April, 2003 (12.04.03), Vol.20, No.4, pages 54 to 64; full text; particularly, page 55, right column, 6th line from the bottom to last line	9,10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/08244

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: 11

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claim 11 pertains to methods for treatment of the human body by therapy and thus relates to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of Article 17(2)(a)(i) of the PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.

2. Claims Nos.:

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.:

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
 No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP03/08244

<Subject of search>

Claims 1, 3, 4 and 6 to 10 involve a hollow nanoparticle having a specific property of "comprising a protein having a function of recognizing a specific cell and being capable of forming a particle" as a matter specifying the invention. Although various hollow nanoparticles having the above property are involved in the scopes thereof, hollow nanoparticles originating in hepatitis B virus surface antigen protein are exclusively supported by the description in the meaning as described in PCT Article 6 and disclosed therein in the meaning as described in PCT Article 5.

Such being the case, the search was made on prior art wherein hepatitis B virus surface antigen protein or its modification was employed as a protein constituting the above hollow nanoparticle.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.C1' A61K9/51, A61K47/42, A61K48/00, A61P1/16, A61P35/00, A61P43/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.C1' A61K9/51, A61K47/42, A61K48/00, A61P1/16, A61P35/00, A61P43/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAPplus(STN), BIOSIS(STN), MEDLINE(STN), EMBASE(STN), WPI, JOIS

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X Y A	EP919568 A1 (SORIN DIAGNOSIS S R L) 1999.06.02 & US 6172193 A & JP 11-253184 A	1-4, 6-8 9, 10 5
X Y	MANGOLD, C. M. et al. 'Analysis of intermolecular disulfide bonds and free sulfhydryl groups in hepatitis B surface antigen particles.' Arch. Virol., 1997, vol. 142, no. 11, p. 2257-2267	1-8 9, 10

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
 「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

17.10.03

国際調査報告の発送日

11.11.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

大久保元浩

印

4C 8828

電話番号 03-3581-1101 内線 3452

C (続き) . 関連すると認められる文献		関連する 請求の範囲の番号
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	
X	PRANGE, R. et al. 'Mutational analysis of HBsAg assembly.'	1-8
Y	Intervirology, 1995, vol. 38, no. 1-2, p. 16-23	9, 10
X	MANGOLD, C. M. et al. 'Secretion and antigenicity of hepatitis B virus small envelope proteins lacking cysteines in the major antigenic region.' Virology, 1995, vol. 211, no. 2, p. 53	1-8
Y	5-543	9, 10
X	BRUCE S. A. et al. 'Mutations of some critical amino acid residues in the hepatitis B virus surface antigen.' J. Med. Virol., 1995, vol. 46, no. 2, p. 157-161	1-4, 6-8
Y		9, 10
A		5
X	ANTONI, B. A. et al. 'Site-directed mutagenesis of cysteine residues of hepatitis B surface antigen. Analysis of two single mutants and the double mutant.' Eur. J. Biochem., 1994, vol. 222, no. 1, p. 121-127	1-4, 6-8
Y		9, 10
A		5
X	MANGOLD, C. M. et al. 'Mutational analysis of the cysteine residues in the hepatitis B virus small envelope protein.' J. Virol., 1993, vol. 67, no. 8, p. 4588-4597	1-8
Y		9, 10
X	ASHTON-RICKARDT, P. G. et al. 'Mutants of the hepatitis B virus surface antigen that define some antigenically essential residues in the immunodominant region.' J. Med. Virol., 1989, vol. 29, no. 3, p. 196-203	1-4, 6-8
Y		9, 10
A		5

C (続き) 関連すると認められる文献		関連する 請求の範囲の番号
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	
Y	WO 01/64930 A1 (JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY CORP) 2001.09.07 & EP 1262555 A1 & JP 2001-316298 A	9, 10
Y	岩崎、上田他 'H b s A g L粒子を用いたヒト肝細胞に対する G F P遺伝子導入法の基礎的研究' 日本外科学会雑誌, 10 March 2002, vol. 103 臨時増刊号 p. 597 PP1159	9, 10
P, Y	妹尾、黒田他 'バイオナノ粒子を用いる遺伝子・薬剤のピンポイ ントドラッグデリバリーシステム' BIO INDUSTRY, 12 Apr. 2003, vol. 20, no. 4, p. 54-64 文献全体、特にp. 55右欄下から第6 行—最下行	9, 10

第I欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT第17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. 請求の範囲 1.1 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、

請求の範囲 1.1 は、治療による人体の処置方法に関する態様を含むものであって、PCT第17条(2)(a)(i) 及びPCT規則39.1(iv)の規定により、この国際調査機関が国際調査を行うことを要しない対象に係るものである。

2. 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をできる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、

3. 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第II欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。

2. 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。

3. 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。

4. 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。

追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

<調査の対象について>

請求の範囲1, 3, 4, 6-10は、「特定の細胞に対する認識能を有し、粒子形成能を有するタンパク質からなる」という、特定の性質を有する中空ナノ粒子を発明特定事項として含むものである。そして、そのような性質の中空ナノとしては様々なものが包含され得るが、PCT 6条の意味において明細書に裏付けられ、また、PCT 5条の意味において開示されている中空ナノ粒子は、B型肝炎ウィルス表面抗原タンパク質に由来するもののみである。

よって、調査は、上記中空ナノ粒子を構成するタンパク質として、B型肝炎ウィルス表面抗原タンパク質もしくはその改変体を採用している先行技術に対して行った。